ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากน้ำยางมันสำปะหลัง

Characterization and Purification of Linamarase from Cassava Latex

นามผู้วิจัย นางสาวอุษา ย้อนโคกสูง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์กล้าณรงค์ ศรีรอต, Dr.Ing.)

กรรมการ ....

(อาจารย์เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, Ph.D.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์วิไล สันติโสภาศรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่............ **เดือน**................ **พ.ศ.**............

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากน้ำยางมันสำปะหลัง

Characterization and Purification of Linamarase from Cassava Latex

โดย

นางสาวอุษา ย้อนโคกสูง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2551

อุษา ย้อนโคกสูง 2551: การศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรส ที่ได้จากน้ำยางมันสำปะหลัง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์กล้าณรงค์ ศรีรอต, Dr.Ing. 125 หน้า

เอนไซม์ลินามาเรส (E.C.3.2.1.21) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มบีต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลินามาริน ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกไซยาโนเจนิก กลูโคไซด์ที่เป็นพิษ และพบทั่วไปในมันสำปะหลัง ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนของน้ำยางจากใบมันสำปะหลังให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยใช้น้ำยางที่มีเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 21.28 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ทำการแยกเอนไซม์จากน้ำยางของมันสำปะหลัง โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต กับวิธีผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose พบว่าได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น 1.21 และ 2.98 เท่า ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 25.71 และ 63.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เมื่อศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ดิบ, เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟ แบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose และเอนไซม์ทางการค้า (Linamarase™) พบว่า เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose จะมีความบริสุทธิ์เช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน ในขณะที่เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นยังไม่บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิดจะคล้ายคลึงกัน คือที่ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ ลินามาเรสจะมีความเสถียรลดลง เมื่อทดสอบด้วย *p*-nitrophenyl -β-D-glucopyranoside ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส คือ 7.0 ซึ่งที่ความเป็นกรดเป็นด่างนี้เอนไซม์มีความคงตัวที่ดี รวมทั้งในสภาวะที่เป็นกรด (pH >3.5) และด่าง (pH <9.0)

เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาใช้ในงานวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ทั้งหมดในส่วนเนื้อและเปลือกของหัวมันสำปะหลัง ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังต้ม ผลิตภัณฑ์ฟลาวและแป้งมันสำปะหลัง (อย่างละ 5 ตัวอย่าง) พบว่า เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose จะให้ผลเทียบเท่ากับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่เอนไซม์ดิบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จะสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในตัวอย่างบางประเภทได้โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับเอนไซม์ทางการค้า

______________________ ______________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Usa Yonkoksung 2008: Characterization and Purification of Linamarase from Cassava Latex. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Klanarong Sriroth, Dr. Ing. 125 pages.

Linamarase (E.C.3.2.1.21) is a β-glucosidase enzyme, capable to hydrolyze linamarin, a toxic cyanogenic glucoside compound naturally occurred in cassava. In this work, purification and characterization of linamarase from cassava latex, being collected from petiole were studied. The specific activity of crude linamarase from the latex was 21.28 unit/mg protein and used for further purification by 2 different methods, i.e. salt precipitation (60 % $(NH_4)_2SO_4$) or anion exchange chromatography using DEAE-cellulose (pH 6.0), yielding the enzyme with increased specific activities by 1.21 and 2.98 folds, respectively. When compared with the commercially available enzyme (Linamarase™), only the enzyme obtained from anion exchange chromatography with the molecular weight size of 70 kDa was pure, as determined by SDS-PAGE electrophoresis. The optimum temperature, as determined by using *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside (pNPG), of all tested enzymes incliuding crude, purified by salt precipitation, purified by anion exchange chromatography and the commercial ones was similar, i.e. at 60^{o}C. However, the enzymes were not stable at that high temperature. All tested enzymes showed the highest activity at pH 7.0 when evaluated by *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside and the enzymes were quite stable in acidic (pH > 3) and alkali (pH < 9) conditions.

Three enzymes, i.e. crude, purified by salt precipitation and purified by anion exchange chromatography were used to determine the total cyanide contents of cassava samples including peels and parenchyma of fresh roots, boiled roots, flour and starch (5 samples each) and compared with the commercial one for analytical purpose. The results suggested that purified enzymes by anion exchange chromatography provided the most equivalent comparable results as the commercial enzymes ($p \leq 0.05$).Yet, in some samples both crude and purified enzymes by salt precipitation were still applicable for analytical works as the analytical results were not significantly different ($p \leq 0.05$).

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์กล้าณรงค์ ศรีรอต (ประธานกรรมการที่ปรึกษา) ดร.เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (กรรมการวิชาเอก) และรองศาสตราจารย์วิไล สันติโสภาศรี (กรรมการวิชารอง) ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในการวิจัยและการศึกษาระดับปริญญาโทมาโดยตลอด รวมทั้ง ดร.สายพิณ ทานัชฌาสัย (ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย) ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนสนับสนุนงานวิจัย และขอขอบพระคุณ ดร. สุนีย์ โชตินีรนาท ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างดี จนงานวิจัยสามารถผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดีขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง สถาบันพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย รวมทั้ง พี่ ๆ เพื่อน ๆและน้อง ๆ หน่วยแป้งทุกท่านที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความอนุเคราะห์ในด้านต่าง ๆ จนงานสำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องที่ให้กำลังใจและส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีมาตลอด และขอบคุณกำลังใจและความช่วยเหลือทั้งหมดจากเพื่อนๆ และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

อุษา ย้อนโคกสูง

ตุลาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	48
ผลและวิจารณ์	59
สรุป	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก รายละเอียดวิธีการทดลอง	106
ภาคผนวก ข การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส	116

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	เนื้อที่เก็บเกี่ยว การผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมันสำปะหลัง ในประเทศผู้ผลิตที่สำคัญของโลกในปี 2547-2549	5
2	องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง	8
3	สารประกอบไซยาไนด์	15
4	แหล่งของเอนไซม์ลินามาเรส	21
5	แหล่งของเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลัง	22
6	ปริมาณไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่กำหนดโดย Codex alimentarius	30
7	เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในวิธีการต่างๆ	37
8	ประสิทธิภาพการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลัง	65
9	ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส(ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด	87
10	ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างฟลาวมันสำปะหลังที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส(ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด	88
11	ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังต้มที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส(ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด	89
12	ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังส่วนเนื้อสดที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส(ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด	90
13	ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังส่วนเปลือกสดที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส(ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด	91
14	ค่าความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข1	คุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)	117
ข2	คุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ	118
ข3	คุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	119
ข4	คุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose	120
ข5	คุณสมบัติด้านความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)	121
ข6	คุณสมบัติด้านความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ	122
ข7	คุณสมบัติด้านความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	123
ข8	คุณสมบัติด้านความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose	124

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่		หน้า
1	สัดส่วนการใช้มันสำปะหลังของประเทศไทย	6
2	ผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลัง	10
3	โครงสร้างทั่วไปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในพืชชั้นสูง	12
4	ตัวอย่างของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์บางชนิดซึ่งมีที่มาจากสารตั้งต้นที่เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	12
5	ปฏิกิริยาการย่อยสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์	13
6	ปฏิกิริยาการสลายตัวของลินามาริน	14
7	วิธีการสังเคราะห์ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์	16
8	แบบจำลองของการสังเคราะห์ลินามารินและการเกิดไซยาไนด์ภายหลังที่มีการฉีกขาดของเซลล์มีโซฟิล (mesophyll cell) ในใบมันสำปะหลัง	17
9	การเคลื่อนย้ายสารไซยาโนจินิคกลูโคไซด์ในมันสำปะหลัง	18
10	กระบวนการสลายไซยาโนเจนิกไดแซคคาไรด์	19
11	การเกิดไซยาโนเจเนซิสจากลินามาริน	24
12	การสลายตัวของอะซีโตนไซยาโนไฮดรินภายใต้พีเอชต่าง ๆ	26
13	การกำจัดพิษไซยาไนด์ โดยเอนไซม์ Rhodanese ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต	28
14	กระบวนการกำจัดพิษไซยาไนด์ ที่มีกรดอะมิโนซีสทิอีน (cysteine) เป็นแหล่งซัลเฟอร์	29
15	ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุ	45
16	การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลัง	50
17	ลักษณะของกิจกรรม และโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลังเมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ที่อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที	62
18	ลักษณะของกิจกรรม และโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลังเมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะของกิจกรรม และโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลัง เมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ที่อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที	64
20	แถบโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลัง ที่ผ่านขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ต่างๆ ที่ศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE	69
21	น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS Molecular weight maker	70
22	อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส ทั้ง 4 ชนิดและความคงตัวของเอนไซม์ (temperature stability) ที่อุณหภูมิต่างๆ	74
23	ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด (optimumpH) และความคงตัวของเอนไซม์ (pH stability) ที่พีเอชต่างๆ	80
24	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไซยาไนด์ที่วิเคราะห์โดยเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟแบบ DEAE-cellulose ในกลุ่มตัวอย่างต่างๆ	93

การศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากน้ำยางมันสำปะหลัง

Characterization and Purification of Linamarase from Cassava Latex

คำนำ

เอนไซม์ลินามาเรส (Linamarase) จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากตัวหนึ่งในงานทางด้านการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลัง ซึ่งมันสำปะหลังนั้นถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย แต่การใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภคของมนุษย์และสัตว์ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากมีสารพิษซึ่งเกิดจากสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside) สารประกอบนี้สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของต้นมันสำปะหลัง รวมทั้งหัวมันที่ใช้ในการแปรรูปและสกัดแป้ง โดยในบริเวณเปลือกจะพบปริมาณสารประกอบไซยาไนด์จะพบในปริมาณที่สูงกว่าในเนื้อมันสำปะหลัง ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในหัวมันจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุในการเก็บเกี่ยว สภาพดิน และสภาวะที่ใช้ในการปลูก เป็นต้น สารประกอบไซยาไนด์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ที่ถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส เกิดเป็นสารประกอบไซยาโนไฮดริน (Cyanohydrin) ซึ่งไม่เสถียรและสลายตัวได้ที่พีเอชสูงกว่า 5.0 หรือสลายตัวโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไฮดรอกซีไนตริลไลเอส เกิดเป็นสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide) ที่สามารถระเหยง่ายและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ของมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการบริโภคจึงมีการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบไซยาไนด์ที่มีสะสมในผลิตภัณฑ์นั้นๆก่อน

ระดับของสารประกอบไซยาไนด์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์นั้นอยู่ในระดับ 3.0 – 3.5 มิลลิกรัมสมมูลไฮโดรเจนไซยาไนด์ต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์นั้นจะมีการใช้เอนไซม์ลินามาเรสเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไซยาโนเจนิคกลูโคไซด์ให้เป็นสารประกอบไซยาโนไฮดรินและกลูโคส จากนั้นจึงทำการเปลี่ยนสารประกอบไซยาโนไฮดรินให้อยู่ในรูปของสารประกอบไซยาไนด์อิสระ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง วิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ

ไซยาไนด์ โดยวิธีทางเอนไซม์ (Enzymatic method) วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ แต่พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นเป็นเอนไซม์ที่มีราคาสูง

ในปัจจุบัน มีงานวิจัยที่นำส่วนต่างๆของมันสำปะหลังมาสกัดเอนไซม์ลินามาเรส อาทิเช่น ส่วนใบ, ก้านใบ, ลำต้น, หัวมัน และน้ำยางของมันสำปะหลัง โดยจากงานวิจัยต่างๆได้ศึกษาถึงขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีการตกตะกอนเกลือ, ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแยกขนาดและแบบแลกเปลี่ยนประจุ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการสกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนของน้ำยางนั้น จะให้ผลของเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมที่สูงและสะดวกในการสกัดเอนไซม์มากกว่าจากส่วนอื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการพัฒนาวิธีการสกัดและเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนน้ำยางของมันสำปะหลัง เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผลิตได้จากน้ำยางของมันสำปะหลังที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากทางการค้า เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมและนำเอนไซม์ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง เพื่อลดต้นทุนในการวิเคราะห์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการและขั้นตอนการทำเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนของน้ำยางมันสำปะหลังให้บริสุทธิ์ โดยแยกเป็นเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose

2. ศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพบางประการของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และเปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า

3. ศึกษาผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง ที่ได้จากเอนไซม์ลินามาเรส 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ดิบ, เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose เปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า

การตรวจเอกสาร

1. มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)

1.1 ความสำคัญ

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญรองลงมาจากธัญพืชชนิดต่างๆมีปลูกทั่วไปในประเทศแถบเมืองร้อน (ระหว่างเส้นรุ้งที่ 30 องศาเหนือและใต้) เช่น อเมริกาใต้ บราซิล เม็กซิโก มันสำปะหลังมักจะปลูกได้ดีในระดับความสูงของพื้นที่ไม่เกิน 2,500 เมตร (6,500 ฟุต) เหนือระดับน้ำทะเล อุณหภูมิระหว่าง 18-35 องศาเซลเซียส มีฝนตกชุกเฉลี่ย 50-300 มิลลิเมตรต่อปี ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดินอยู่ระหว่าง 5.0-5.9 สำหรับประเทศไทยมันสำปะหลังไม่ใช่พืชดั้งเดิม แต่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอเมริกากลางและใต้ แล้วขยายการปลูกไปสู่แอฟริกาและทวีปเอเชียในเวลาต่อมา ปัจจุบันมีการปลูกมันสำปะหลังในประเทศต่างๆกว่า 90 ประเทศทั่วโลก

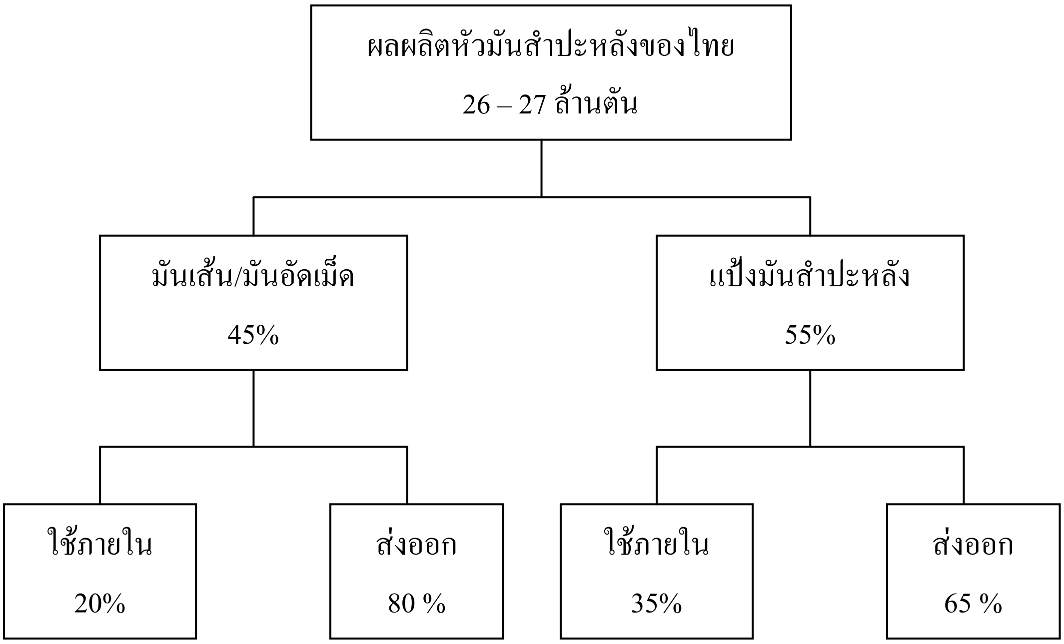
มันสำปะหลังเข้าสู่ประเทศไทยโดยการนำมาจากมาเลเซียมีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น มันไม้ มันสำโรง และมันสำปะหลัง มีคุณสมบัติเด่นคือ ปลูกได้ง่ายและปลูกได้ตลอดทั้งปีไม่ต้องใช้น้ำมาก ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ดูแลรักษาง่าย ให้ผลผลิตสูง ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการเพาะปลูกและผลผลิตมันสำปะหลังมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก คือมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6.7 ล้านไร่ โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก แหล่งผลิตสำคัญ 5 จังหวัดแรก ได้แก่ นครราชสีมา ชัยภูมิ ฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร และชลบุรี สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ประมาณ 22-23 ล้านตัน ใช้ในประเทศประมาณ 4-6 ล้านตัน ในรูปแป้งมันสำปะหลังสำหรับบริโภค และมันเส้นหรือมันอัดเม็ดใช้ทำอาหารสัตว์ ที่เหลือส่งออก โดยในปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับ 1 ของโลก ครองส่วนแบ่งการตลาดมากกว่าร้อยละ 80 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2550, http://oae.go.th) โดยที่ปริมาณผลผลิตหัวมันสำปะหลังสดของประเทศไทย จัดเป็นอันดับที่ 3 ของโลก หรือคิดเป็นร้อยละ 10 ของผลผลิตโลก ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เนื้อที่เก็บเกี่ยว การผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมันสำปะหลัง ในประเทศผู้ผลิตที่สำคัญของโลกในปี 2547-2549

ประเทศ	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (1,000 ไร่)			ผลผลิต (1,000 ตัน)			ผลผลิตต่อไร่ (กก.)		
	2547	2548	2549	2547	2548	2549	2547	2548	2549
รวมทั้งโลก	111,903	112,573	113,840	206,782	205,736	218,569	1,848	1,828	1,920
ไนจีเรีย	22,069	23,638	23,638	38,845	41,565	41,565	1,760	1,758	1,758
บราซิล	10,968	11,790	11,885	23,927	25,725	26,713	2,182	2,182	2,248
ไทย[1/]	6,608	6,162	6,693	21,440	16,938	22,584	3,244	2,749	3,375
อินโดนีเซีย	7,849	7,648	7,643	19,425	19,459	19,928	2,475	2,544	2,607
คองโก	11,516	11,534	11,534	14,951	14,974	14,974	1,298	1,298	1,298
โมซัมบิก	6,678	6,906	6,906	6,413	11,458	11,458	960	1,659	1,659
กานา	4,900	4,688	4,688	9,739	9,567	9,567	1,988	2,041	2,041
อังโกลา	4,273	4,679	4,679	8,587	8,606	8,606	2,010	1,839	1,839
เวียดนาม	2,429	2,705	2,968	5,821	6,646	7,714	2,396	2,457	2,599
อินเดีย	1,509	1,512	1,515	6,906	6,977	7,620	4,577	4,614	5,030
อื่นๆ	33,104	31,311	31,691	50,728	43,821	47,840	1,532	1,400	1,510

หมายเหตุ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2550)
ที่มา: องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (2550)

ผลผลิตมันสำปะหลังที่ผลิตได้ภายในประเทศจะนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรม คือ ประมาณร้อยละ 45 ใช้ทำเป็นมันเส้นและมันอัดเม็ด อีกร้อยละ 55 ใช้ในการแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์ ,2542) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สัดส่วนการใช้มันสำปะหลังของประเทศไทย

1.2 ลักษณะทั่วไปของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีชื่อทั่วไปเป็นภาษาอังกฤษว่า Cassava ในภาษาสเปนเรียก yuca ส่วนภาษาโปรตุเกสและฝรั่งเศส จะเรียกว่า madioca และ manioc ตามลำดับ การจัดหมวดหมู่ของมันสำปะหลัง (กรมวิชาการเกษตร, 2526) คือ

Genus Manihot

Family Eupharbiaceae

Subdivision Angiospermae

Class Dicotyledonae

Order Geraniales

มันสำปะหลังมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Manihot esculenta* Crantz ลักษณะทั่วๆไปคือ ส่วนต้นจะเป็นแบบ woody stem ซึ่งจะมีแก่นใหญ่ ทำให้หักง่ายความสูงและการแตกจะขึ้นอยู่กับพันธุ์โดยเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 3-6 เซนติเมตรขึ้นอยู่กับอายุในสภาพที่ปลูก สีของลำต้นจะเป็นสีเหลือง น้ำตาล หรือ สีเงินขึ้นอยู่กับพันธุ์ ส่วนใบจะเป็นแบบ simple leaf ติดอยู่กับก้านใบ โดยใบจะจัดแบบ spiral phyllotaxy จะมี lope ในแต่ละแผ่นใบประมาณ 3-9 lope ขึ้นกับพันธุ์ ส่วนรากซึ่งเป็นส่วนที่สะสมของแป้ง พบว่าแป้งจะอยู่ในส่วนของแกนกลางโดยจะอยู่ในส่วนที่เป็น Cell parenchyma ซึ่งมีอยู่ทั้งในส่วนของเปลือกและแกนกลาง แต่ในเปลือกมีปริมาณแป้งสะสมอยู่น้อยกว่าประมาณเท่าตัว

1.3 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลังซึ่งวิเคราะห์ในรูปส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม ของมันสำปะหลังสดมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	เจริญศักดิ์ (2532)	Balagopalan และคณะ (1988)	Beynum และ Roles (1985)
ความชื้น (ร้อยละ)	63.28	59.40	66.00
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	29.73	38.10	26.00
โปรตีน (ร้อยละ)	1.18	0.70	1.00
ไขมัน (ร้อยละ)	0.08	0.20	0.30
เถ้า (ร้อยละ)	0.85	1.00	*
เยื่อใย (ร้อยละ)	0.99	0.60	1.00
โปตัสเซียม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.26	*	*
ฟอสฟอรัส(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.04	4.00	*
กรดไฮโดรไซยานิก (มิลลิกรัมไฮโดรเจนไซยาไนด์ต่อกิโลกรัม)	173	15-400	*
วิตามินซี(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	*	252	*

ที่มา : กล้าณรงค์ (2542)

หมายเหตุ * ไม่มีการรายงาน

1.4 อายุและฤดูการเก็บเกี่ยว

มันสำปะหลังเป็นพืชที่สามารถยืดหยุ่นอายุการเก็บเกี่ยวได้ จากที่มีผู้ทำการศึกษาพบว่ามันสำปะหลังจะเริ่มมีหัวเมื่อมีอายุประมาณ 3 เดือนเป็นต้นไป หัวจะเริ่มเติบโตขึ้นเรื่อยๆ โดยการสะสมแป้งมากขึ้น ฤดูกาลเก็บเกี่ยวก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อคุณภาพของหัวมันสำปะหลัง กล่าวคือ การเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งหรือช่วงที่อากาศแห้งติดต่อกันโดยไม่มีฝนตกหรือดินมีความชื้นต่ำ จะทำให้หัวมันสำปะหลังมีน้ำน้อยเป็นผลให้มีปริมาณแป้งสูงกว่าการเก็บเกี่ยวในช่วงที่มีฝนตกชุก ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จะเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือน พฤศจิกายนถึงเดือนเมษายนเนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงฤดูแล้ง ผลการสำรวจมันสำปะหลังโรงงานปี 2547 เกษตรกรจะทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตตั้งแต่เดือนตุลาคม 2546 ถึงเดือนกันยายน 2547 โดยมีช่วงการเก็บเกี่ยวมากที่สุดคือ เดือนธันวาคม 2546 (ร้อยละ 20.65) รองลงมาคือเดือนมกราคม 2547 (ร้อยละ 19.12) และเก็บเกี่ยวน้อยที่สุดเดือนมิถุนายน 2547 (ร้อยละ 1.33) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

1.5 ผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังที่ใช้ส่วนใหญ่มักจะนำมาแปรรูป เช่น ฟลาวมันสำปะหลัง, มันต้ม, แป้งมันสำปะหลังและ มันเส้น มันอัดเม็ด มีดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรมีปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในระดับที่ปลอดภัย เพื่อการใช้ประโยชน์ องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (Food and Agricultural organization/World Health organization [FAO/WHO]) ได้กำหนดมาตรฐานระดับปริมาณไซยาไนด์ที่ปลอดภัยในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังไว้ใน Codex Alimentarius (1989) ว่าต้องอยู่ในระดับไม่เกิน 10 มิลลิกรัมไฮโดรเจนไซยาไนด์ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่หัวมันสดของสายพันธุ์ที่มีรสขมอาจมีระดับไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์สูงถึง 1,500 มิลลิกรัมไซยาไนด์ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงเกินกว่าระดับที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค

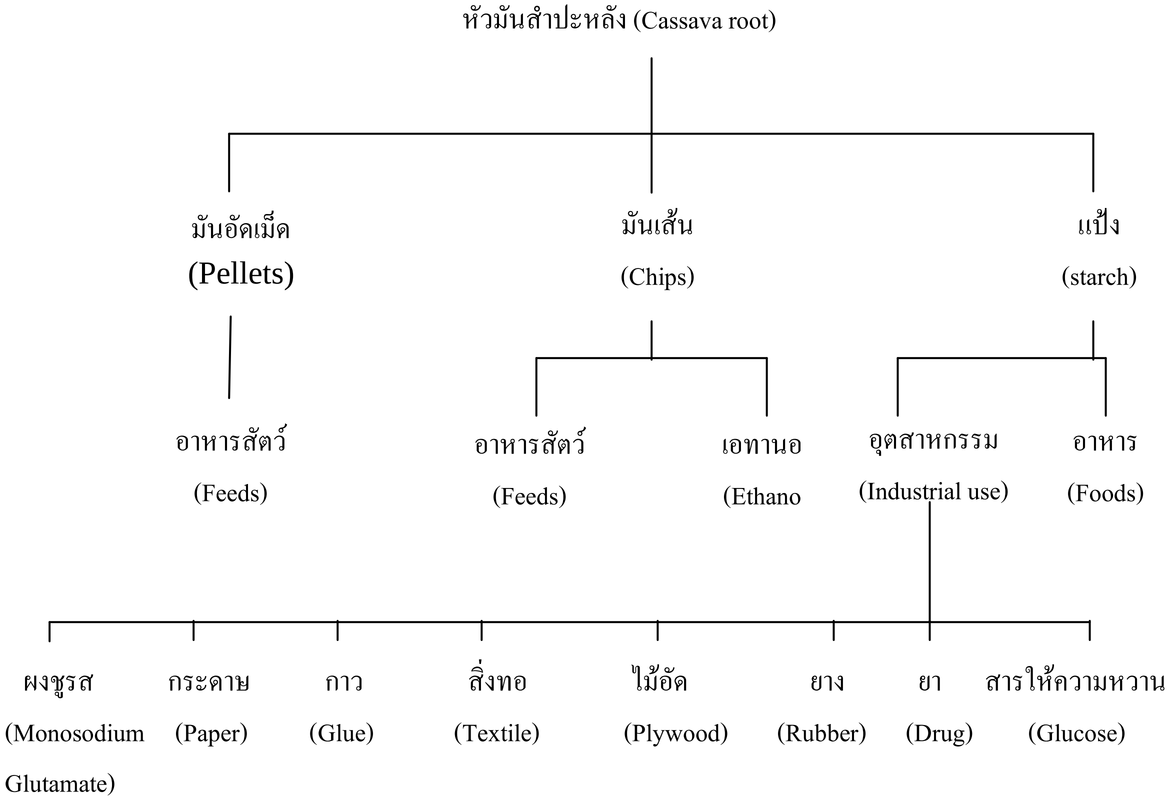
ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 14-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (กล้าณรงค์, 2542)

1. กลุ่มระดับไม่เป็นพิษ (innocuous) คือ หัวมันที่มีปริมาณไซยาไนด์อยู่น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหัวมันที่ปอกเปลือก

2. กลุ่มระดับเป็นพิษปานกลาง (moderately poisonous) คือ หัวมันที่มีปริมาณไซยาไนด์ตั้งแต่ 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหัวมันที่ปอกเปลือก

3. กลุ่มระดับเป็นพิษอันตราย (dangerous poisonous) คือ หัวมันที่มีปริมาณไซยาไนด์อยู่มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหัวมันที่ปอกเปลือก

นอกจากนี้ยังพบว่าอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังด้วย การเก็บเกี่ยวในช่วงอายุ 8-10 เดือนจะพบปริมาณไซยาไนด์สูง (210 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) หากเก็บเกี่ยวที่ช่วงอายุ 12 เดือนประมาณไซยาไนด์จะต่ำลงเหลือเพียง 16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิไลและคณะ, 2541)

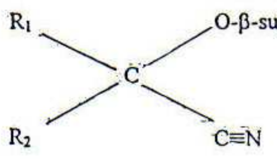


ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลัง

2. สารประกอบไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง

2.1 การกระจายตัว โครงสร้างและบทบาท

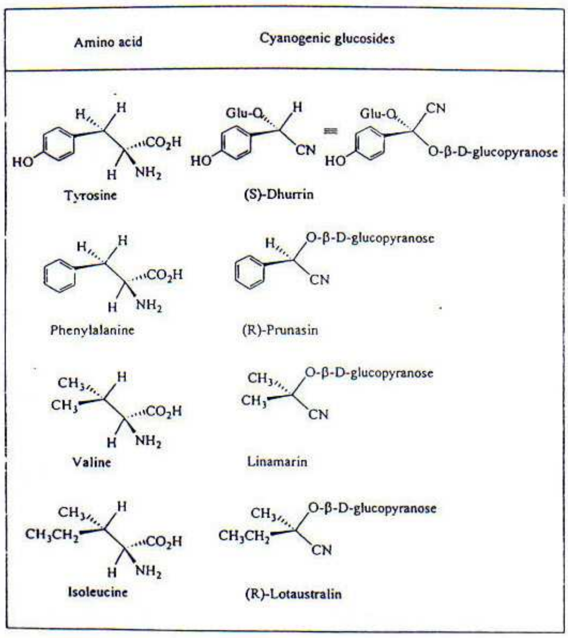
มันสำปะหลังเป็นพืชชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างไซยาไนด์ขึ้นได้เฉกเช่นเดียวกับข้าวสาลี (wheat : *Triticum aestivum* ข้าวบาร์เลย์ (barley : *Hordeum vulgare*) ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งมีรายงานไว้อย่างน้อย 2,600 สปีชี่ส์ใน 130 ตระกูล นับตั้งแต่การค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1803 จนถึงปัจจุบัน (Jone,1997 ; Hughes, 1999) ถึงแม้ว่าไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide, HCN) จะเกิดขึ้นได้ในปริมาณเล็กน้อยในเนื้อเยื่อพืชทุกชนิด เช่น จากการสังเคราะห์เอธิลีน (ethylene biosynthesis) แต่ในพืชตระกูลที่สามารถสร้างไซยาไนด์ในปริมาณมากนั้นจะเกิดขึ้น เนื่องจากการที่เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายเท่านั้น ปรากฏการณ์ที่พืชสามารถปลดปล่อยไฮโดรเจนไซยาไนด์จากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเรียกว่า ไซยาโนเจเนซิส (cyanogenesis) โดยในพืชทั่วไปจะพบไฮโดรเจนไซยาไนด์ในรูปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) นอกเหนือจากที่พบในอาณาจักรพืชในตระกูล เช่น *Compositae, Euphorbiaceae, Linaceae, Papaveraceae, Fabaceae (Leguminosae), Polypodiaceae, Myrtaceae Rosaceae, Saxifragceae, Scrophulariaceae, Myoporaceae, Caprifoliaceae, Mimosaceae* และ *Oleaceae* แล้ว (Vetter, 2000) ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ยังพบได้ในแมลง แบคทีเรีย รา และเฟิร์น (Vennesland และคณะ, 1982) โครงสร้างโดยทั่วไปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์มีลักษณะดังภาพที่ 3 ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนไกลโคน (glycone) ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) และเชื่อมต่อกับส่วนอไกลโคนด้วยพันธะบีต้า-กลูโคซิดิก ส่วนอไกลโคน (aglycone) มาจากกรดแอลฟา-อะมิโน (α-amino acid) ตัวอย่างโครงสร้างของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์บางชนิดดังแสดงในภาพที่ 4 โดยพบว่าพืชที่ให้ไฮโดรเจนไซยาไนด์จะมีอยู่ประมาณ 475 สปีชี่ส์ด้วยกัน โดยระบุได้จากการย่อยสลายสารประกอบไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ด้วยเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดส (β-glucosidase) เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด ตามด้วยการแยกสลายส่วนอไกลโคน (aglycone) ซึ่งเรียกว่า ไซยาโนไฮดริน (cyanohydrin) ไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบคาร์บอนิลและไฮโดรเจนไซยาไนด์ โดยเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริลไลเอส (α-hydroxynitrile lyase) ดังแสดงในภาพที่ 5 ปรากฏการณ์ไซยาโนเจเนซิสนี้เป็นที่เข้าใจว่าเป็นกลไกป้องกันตนเองของพืชต่อการทำลายโดยสัตว์และแมลง เช่น เม่น(*Zonocerus variegates*) หมูป่า ลิงบาบูน และหนู (Jones, 1998)



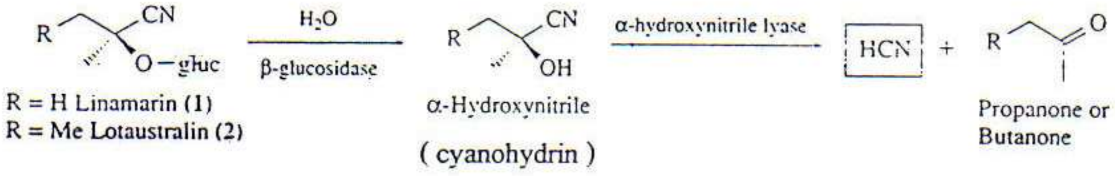
ภาพที่ 3 โครงสร้างทั่วไปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในพืชชั้นสูง

R_1 เป็นหมู่อะลิฟลาติก (aliphatic) หรือ หมู่อะโรเมติก (aromatic)

R_2 ส่วนใหญ่มักเป็นอะตอมไฮโดรเจน (H)

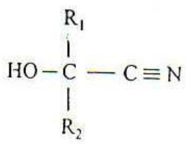


ภาพที่ 4 ตัวอย่างของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์บางชนิดซึ่งมีที่มาจากสารตั้งต้นที่เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาการย่อยสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์
ที่มา: Hughes (1999)

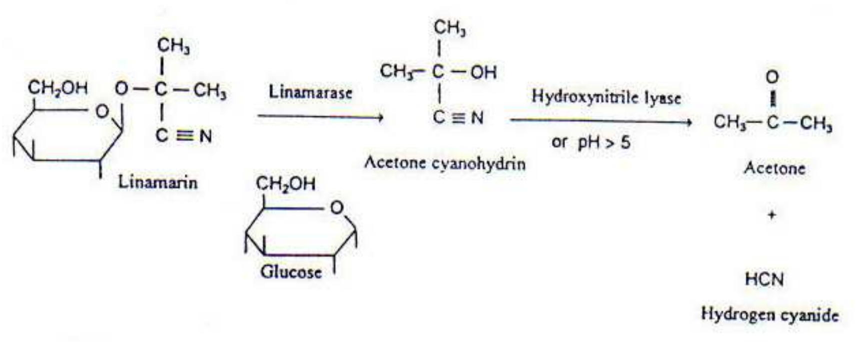
ไซยาโนไฮดรินหรือแอลฟาไฮดรอกซีไนตริลเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ที่เกิดขึ้นในวิถีการเกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์ มีที่มาจากกรดแอลฟา-อะมิโน เช่น เวลีน (valine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) เฟนิลอะลานีน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) โครงสร้างโดยทั่วไปเป็นดังนี้



R_1 โดยทั่วไปมักเป็นหมู่อะลิฟาติก (aliphatic) หรือหมู่อะโรเมติก (aromatic) ขณะที่ R_2 โดยส่วนใหญ่เป็นอะตอมไฮโดรเจน ถ้าทั้ง R_1 และ R_2 เป็นหมู่อะลิฟาติก ไซยาโนไฮดรินชนิดนั้นจะเกิดจากกรดอะมิโนเวลีน ไอโซลิวซีนหรือลิวซีน ถ้าหมู่ R อันหนึ่งเป็นหมู่ฟีนอลิก (phenolic group) จะเกิดจากกรดอะมิโน เฟนิลอะลานีนและไทโรซีน ตัวอย่างเช่น พรูนาซิน (prunasin)

สารประกอบไซยาไนด์ที่เกิดขึ้นในมันสำปะหลังพบได้ 3 รูปแบบคือ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ ไซยาโนไฮดรินและไซยาไนด์อิสระ โดยส่วนใหญ่สารประกอบไซยาไนด์จะอยู่ในรูปของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ ส่วนไซยาโนไฮดรินและไซยาไนด์อิสระจะพบมากขึ้นเมื่อมีการทำลายเนื้อเยื่อ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ที่พบในมันสำปะหลังอยู่ในรูปของลินามาริน (linamarin หรือ 2-hydroxyisobutyronitrile-β-D-glucoside) และโลทอสตราลิน (lotaustralin หรือ 2-hydroxy-2-methylbutyronitrile-β-D-glucoside) โดยที่ลินามารินมีอยู่ร้อยละ 93-97 และโลทอสตราลินมีอยู่ร้อยละ 3-7 (Bisset และคณะ, 1969 ; Hughes และคณะ, 1994) ทั้งลิมานารินและโลทอสตราลินต่างถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลูโคไซเดสจำเพาะที่มีชื่อว่า ลินามาเรส (linamarase) ได้ผลิตภัณฑ์ที่

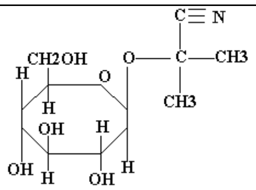
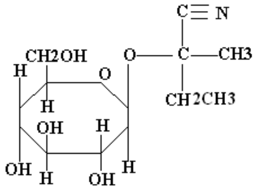
เป็นกลูโคสและโพรพาโนนไซยาโนไฮดริน (propanone cyanohydrin) ในกรณีที่เป็นลินามารินหรือได้บิวทาโนนไซยาโนไฮดริน (butanone cyanohydrin) ในกรณีที่เป็นโลทอสตราลิน ไซยาโนไฮดรินที่เกิดขึ้นจะไม่เสถียร จึงเกิดการสลายตัวโดยทันทีต่อไปเมื่อมีการเพิ่มพีเอชหรือโดยการทำงานของเอนไซม์ตัวที่สองที่มีชื่อว่า ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส (hydroxynitrile lyase) เกิดเป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์และโพรพาโนน (Propanone; Acetone หรือ dimethyl ketone) ดังตารางที่ 3 ในกรณีที่เป็นลินามาริน ปฏิกิริยาสลายตัวของลินามารินได้แสดงไว้ดังในภาพที่ 6 หรือเกิดบิวทาโนน (Butanone หรือ ethyl methyl ketone) ในกรณีที่เป็นโลทอสตราลิน



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาการสลายตัวของลินามาริน

ที่มา: Brimer และ Dalgaard (1984)

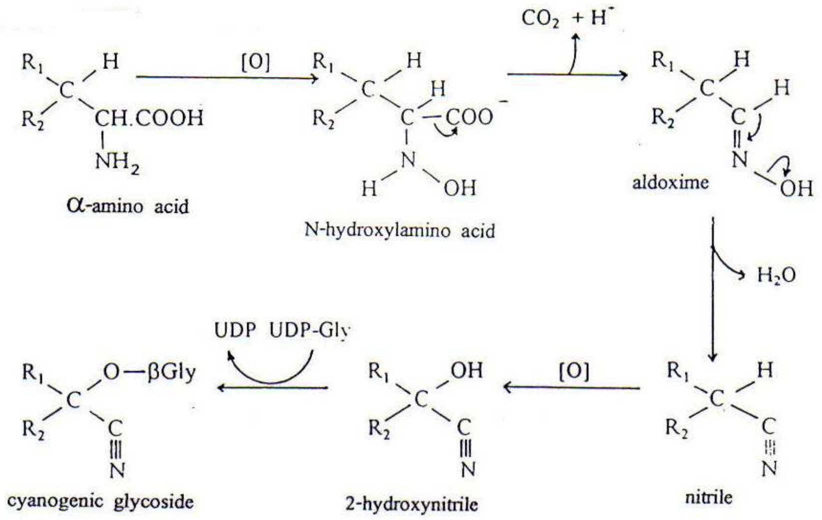
ตารางที่ 3 สารประกอบไซยาไนด์ (Cyanogens) 3 รูปแบบ

สารประกอบไซยาไนด์	โครงสร้าง	ชื่อทั่วไป	ชื่อ IUPAC
1. Cyanogenic Glucosides (Bound cyanides)		Linamarin	2-hydroxy isobutyronitrile -β-D-glucoside
		Lotaustralin	2-hydroxy-2-methylbutyronitrile-β-D-glucoside
2. Cyanohydrins	CH_3 – HO-C-CH_3 – C≡N	Acetone cyanohydrin หรือ Propanone cyanohydrin	2-hydroxy isobutyronitrile
	CH_2CH_3 – HO-C-CH_3 – C≡N	Butanone cyanohydrin	2-hydroxy-2-methylbutyronitrile
3. Free cyanide	H-C≡N	Hydrogen cyanide หรือ Hydrocyanic acid	-

2.2 การสังเคราะห์ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในมันสำปะหลัง

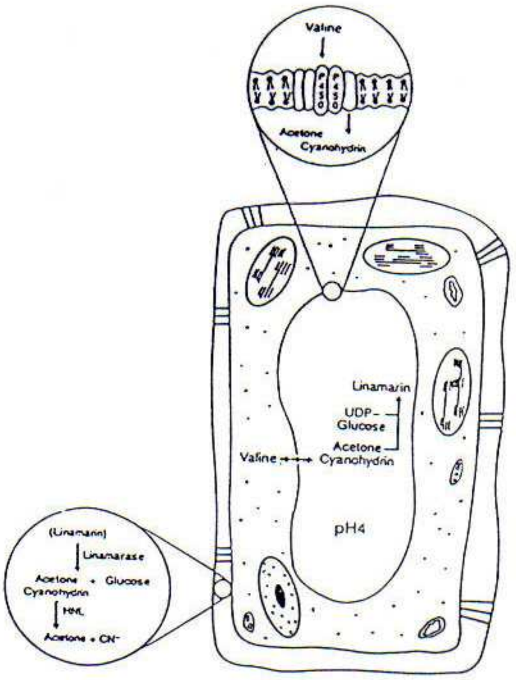
วิธีการสังเคราะห์ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์โดยทั่วไปแสดงดังในภาพที่ 7 เริ่มจากกรดแอลฟา-อะมิโน (α-amino acid) เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) กลายเป็น N-hydroxylamino acid จากนั้นเกิดการสูญเสียหมู่คาร์บอกซิลกลายเป็น aldoxime และเปลี่ยนต่อไปเป็นไนตริล หลังจากนั้นไนตริลจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซีเข้าที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งบีต้าเกิดเป็น

2-hydroxynitrile ซึ่งจะถูกเติมน้ำตาลเข้าไปโดยปฏิกิริยาไกลโคซิเลชัน (glycosylation) เกิดเป็นสารประกอบไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (Tapper และ Reay, 1973)



ภาพที่ 7 วิธีการสังเคราะห์ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์
ที่มา: ดัดแปลงจาก Tapper และ Reay (1973)

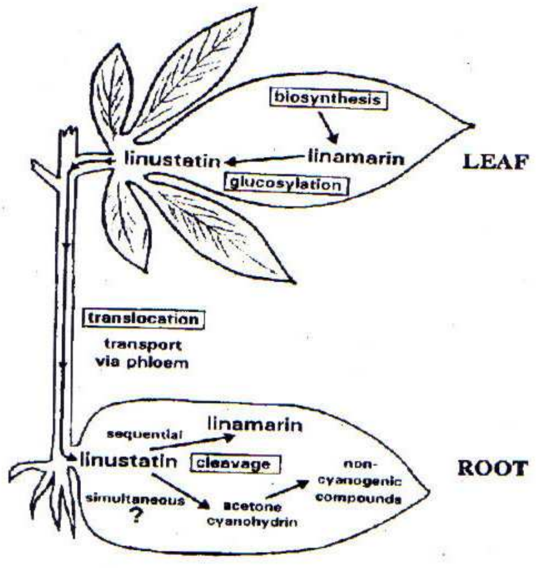
สำหรับการสังเคราะห์ลินามารินนั้น กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นคือเวลีน (Valine) การเปลี่ยนเวลีนเป็นอะซีโตน ไซยาโนไฮดรินต้องอาศัยการเร่งปฏิกิริยาโดย cytochrome P-450 ที่ต้องอาศัย NADPH ปฏิกิริยาในขั้นแรกเป็นปฏิกิริยา N-hydroxylation ของเวลีนตามมาด้วยการเกิด 2-methylpropanol oxime และเกิดการสูญเสียน้ำกลายเป็น 2-methylpropionitrile การเติมออกซิเจนจะทำให้ได้อะซีโตน ไซยาโนไฮดรินขึ้น ซึ่งต่อมาจะถูกเติมน้ำตาลกลูโคส โดยการทำงานของเอนไซม์ UDPG-glucosyltransferase ที่ละลายได้เกิดเป็นลินามาริน จากการศึกษาปฏิกิริยาในขั้นแรกพบว่าสามารถเกิดขึ้นในส่วนสกัดจากเยื่อหุ้ม (membrane fraction) ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า อะซีโตนไซยาโนไฮดรินอาจถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเอนไซม์ที่อยู่บนโทนอพลาสต์ (tonoplast) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดโมเลกุลน้ำตาลอาจอยู่ในแวคิวโอล ซึ่งเป็นแหล่งที่เก็บลินามาริน (ภาพที่ 8) (Vetter, 2000)



ภาพที่ 8 แบบจำลองของการสังเคราะห์ลินามาริน และการเกิดไซยาไนด์ภายหลังที่มีการฉีกขาดของเซลล์มีโซฟิล (mesophyll cell) ในใบมันสำปะหลัง

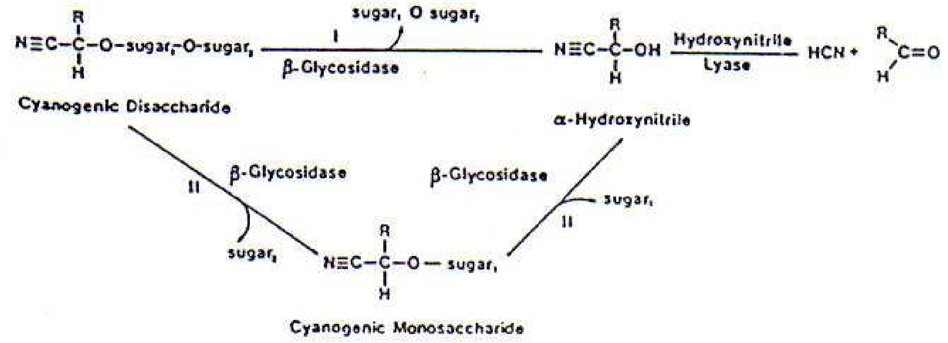
ที่มา: Vetter (2000)

การสังเคราะห์ลินามารินส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ใบอ่อนและก้านใบ (petiole) มีเพียงส่วนน้อยที่เกิดขึ้นที่ราก ดังนั้นลินามารินที่อยู่ในรากจึงมาจากการขนส่งลงมาจากใบผ่านระบบท่อลำเลียงของพืช เนื่องจากในท่อลำเลียงโฟลเอ็ม (pholem) มีเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดสอยู่มาก จึงมีการเปลี่ยนลินามารินซึ่งเป็นมอโนกลูโคไซด์ให้กลายเป็นลินูสเตติน (linustatin) ซึ่งเป็นไดกลูโคไซด์และไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดสชนิดใด ๆ ในท่อลำเลียง เมื่อถึงเนื้อเยื่อบริเวณราก ลินูสเตตินจะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็นลินามารินและเก็บไว้ในแวคิวโอล (Selmar, 1994 ; Vetter, 2000) ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในรากมันสำปะหลังอ่อนนั้นจะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอตลอดหัว (ภาพที่ 9) เมื่อรากมีอายุมากขึ้นเป็น 12 เดือน ความเข้มข้นสูงสุดจะมาอยู่ที่ส่วน phelloderm และลดความเข้มข้นลงเป็นลำดับเมื่อเข้าสู่แกนกลางของหัวมัน (Vetter, 2000)



ภาพที่ 9 การเคลื่อนย้ายสารไซยาโนจินิคกลูโคไซด์ในมันสำปะหลัง
ที่มา: Selmar (1994)

การย่อยสลายไซยาโนเจนิกไดแซคคาไรด์ เช่น ลินูสเตติน (Linustatin) ที่ลำเรียงมาจากใบสู่รากนั้น อาจเป็นไปได้ 2 วิถี (ภาพที่ 10) คือ วิถีการสลายแบบเกิดขึ้นทันที (simultaneous pathway) หรือวิถีการสลายแบบเป็นลำดับขั้น (sequential pathway) แบบแรกนั้นเมื่อเกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดสจะได้ ไดแซคคาไรด์และอไกลโคน (ในกรณีที่เกิดขึ้นกับลีนูสเตตินจะได้เจนติโอไบโอส (gentiobiose) และอะซีโตนไซยาโนไฮดริน) ส่วนแบบหลังจะต้องอาศัยการเร่งการย่อยสลายโดยเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดสที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ตัวอย่างเช่น การย่อยสลาย amygdalin ใน black cherry การทำงานของเอนไซม์ตัวแรก คือ amygdalin hydrolase จะได้กลูโคสและไซยาโนเจนิกมอโนแซคคาไรด์ที่ชื่อว่า prunasin ซึ่งจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ตัวต่อไป คือ prunasin hydrolase ได้เป็นกลูโคสและ mandelonitrile (Poulton, 1990 ; Hughes, 1999)



ภาพที่ 10 กระบวนการสลายไซยาโนเจนิกไดแซคคาไรด์

กลไกการสลายแบบเกิดขึ้นทันที (I) และกลไกการสลายแบบเป็นลำดับขั้น (II)

ที่มา: Poulton (1990)

3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลินามารินไปเป็นไซยาไนด์

3.1 เอนไซม์ลินามาเรส (Linamarase)

เอนไซม์ลินามาเรส (linamarase, E.C.3.2.1.21 : Linamarin β-D-glucoside glucohydrolase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ β-glucosidaase ที่มีความจำเพาะต่อลินามารินและโลทอสตราลิน ซึ่งมีบทบาทเป็นสับสเตรทในธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรส โดยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสับสเตรทเหล่านี้เกิดเป็นไซยาโนไฮดรินและกลูโคส โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาย่อยสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ ที่เกิดขึ้นในมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลัง

3.1.1 บทบาท และหน้าที่ของเอนไซม์ลินามาเรส

บทบาทและหน้าที่ที่สำคัญของเอนไซม์ลินามาเรสนั้น นอกจากจะมีบทบาทในกระบวนการทางธรรมชาติ ซึ่งเป็นกระบวนการป้องกันตนเองของพืชและแมลงที่ผลิตไซยาโนเจ นิกกลูโคไซด์ได้แล้วนั้น สำหรับมนุษย์นั้นร่างกายจะรับเอาสารพิษที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการดังกล่าว ซึ่งก็คือ ไซยาไนด์ (HCN) เข้าสู่ร่างกายและเมื่อรับในปริมาณที่มากเกินระดับที่ร่างกายจะรับได้นั้น ก็จะเป็นอันตรายจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นนอกจากบทบาทของเอนไซม์ลินามาเรสที่มี

ประโยชน์ต่อพืชในการป้องกันตนเองแล้วนั้น สำหรับมนุษย์เองประโยชน์ของเอนไซม์ลินามาเรสก็คือการนำเอนไซม์ลินามาเรสไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์ของพืชที่ผลิตสารประกอบไซยาไนด์หรือผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ใช้สำหรับบริโภคเพื่อให้ทราบถึงปริมาณที่จะไม่เป็นอันตรายถึงชีวิตต่อผู้บริโภคเอง โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่สำคัญสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ก็คือวิธีทางเอนไซม์ (Enzymatic assay)

3.1.2 แหล่งที่มาของเอนไซม์ลินามาเรส

ลินามาเรสพบในพืชหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบในรา ยีสต์ แบคทีเรีย และแมลงดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ได้มีการศึกษาพบว่าเป็นไกลโคโปรตีนและมีขนาดโมเลกุลตามธรรมชาติในระดับที่แตกต่างกัน และประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยที่มีขนาด 55-66 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 ค่า isoelectric point (pI) อยู่ในช่วง 4.0-5.5 (Poulton, 1990) เอนไซม์นี้ยังมีความสามารถในการไฮโดรไลซ์สับสเตรทในธรรมชาติ ได้แก่ ลินามาริน (Linamarin) และโลทอสตราลิน (Lotaustralin) ซึ่งเป็น Cyanogenic glucosides ที่พบในมันสำปะหลัง และสับสเตรทสังเคราะห์ ได้แก่ *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside และ *p*-nitrophenyl-β-D-galactoside (Hughes, 1999)

สำหรับลินามาเรสในมันสำปะหลังนั้นพบว่าสามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนพาเรนคิมาของราก (parenchyma root tissue) เนื้อเยื่อส่วนคอร์เท็กซ์ของราก (root cortex tissue) ลำต้น (stem) ก้านใบ (petiole) ใบ และน้ำยาง (latex) (Cooke และคณะ, 1978 ; Eksittikul และ Chulavatnatol, 1988 ; Yeoh, 1989 ; Mkpong และคณะ, 1990 ; Nambisan, 1999) ดังสรุปรวมไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แหล่งของเอนไซม์ลินามาเรส

แหล่งกำเนิด	ขนาดโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	สภาวะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์		อ้างอิง
		พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
ยีสต์และรา				
Aspergilus sydowi	-	4.5-6.0	50	Ikediobi และคณะ,1985
Fusarium equiseti	-	6.0	45	Ikediobi และคณะ,1987
Endromyces fibuliger	-	4.0-5.0	40	Brimerและคณะ,1998
แบคทีเรีย				
Leuconostoc mesenteroides	145	6.0-6.5	29	Okaforและ Ejiofor,1985
แมลง				
Zygaena trifolii Esper	130	4.5-5.0	40	Franzlและคณะ, 1989
พืช				
White clover	103-105	-	-	Hughesและ Dunn,1982
(*Trifolium repens* L.)	-	5.5	-	Posciและคณะ, 1989
Flaxseed				
(*Linum ussitatissinum*)	630	5.5-6.0	-	Fanและ Conn,1985
butter bean				
(*Phaseolus lunatus*)	125	5.1-6.0	62	Nashidaและคณะ,1987
rubber tree				
(*Hevea brasiliensis*)	$>$64	-	-	Selmarและคณะ, 1987
Cassava				(ตารางที่ 5)
(*Manihot esculenta* Crantz)				

ตารางที่ 5 แหล่งของเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลัง

แหล่งที่มา	สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์		การวัดกิจกรรมเอนไซม์		อ้างอิง
	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สับสเตรท	กิจกรรมเอนไซม์ (units)	
1. เปลือกสด	5.5	-	Linamarin	-	Wood ,1966
	5.5	-	Linamarin	329*	Cookeและคณะ,1977
	6.0	55	pNPG	400*	Yeoh,1989
	6.0	-	linamarin	4****	Nambisan,1999
2. ใบมัน	6.0	55	pNPG	917*	Yeoh,1989
	3.5	55	pNPG	-	Mpkong,1990
	6.0	-	pNPG	-	Yeohและคณะ,1997
	6.0	-	linamarin	3****	Nambisan,1999
					Haqueและ Bradbury,1999
3. หัวมัน	6.0	-	pNPG	3.3*	Yeoh,1989
4. ลำต้น, ก้านใบ และหัวมัน	6.0	-	pNPG	2034**	Eksittikulและ Chulavatanatol,1988
5. น้ำยาง	6.0	35	pNPG	316***	Eliasและคณะ,1997
	6.0	35	linamarin	1’000****	Nambisan,1999

หมายเหตุ: pNPG คือ *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside

สัญลักษณ์ *= nkat/mg protien, **= μmol/min, ***= μg/min,

****=μmol of cyanide/min

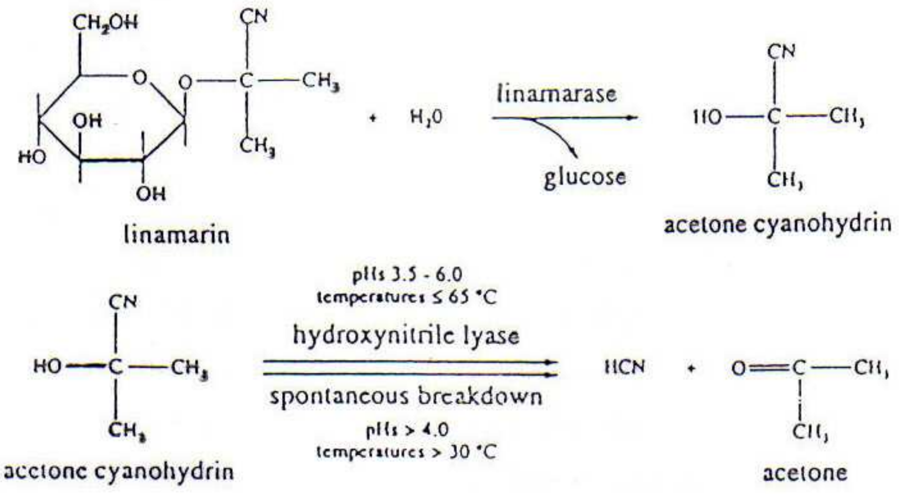
Cooke *et al.* (1977) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดจากเนื้อเยื่อส่วนพาเรนคิมาและส่วนคอร์เท็กซ์ของราก พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นช่วงกว้าง สูงสุดที่พีเอช 6.0 ขณะที่พีเอช 5.0 และ 7.0 ยังคงมีการทำงานอยู่ถึงร้อยละ 79 และ 86 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yeoh (1989) ที่ใช้เอนไซม์สกัดจากใบ เปลือกและส่วนคอร์เท็กซ์ของราก ซึ่งพบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 6.0-7.3 และพีเอชคือ 5.0 และ 8.0 เอนไซม์ยังคงมีการทำงานอยู่ถึงร้อยละ 85 นอกจากนี้ Yeoh ยังพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมินี้เอนไซม์จะไม่เสถียร จะมีแต่เอนไซม์ที่สกัดจากส่วนคอร์เท็กซ์ของรากเท่านั้นที่ทนต่ออุณหภูมิดังกล่าวได้ โดยสูญเสียการทำงานไปน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับที่สกัดได้จากใบและเปลือกราก

Eksittikul and Chulavatanatol (1988) สกัดและแยกเอนไซม์ลินามาเรส จากก้านใบ ลำต้นและส่วนคอร์เท็กซ์ของราก พบว่ามีเอนไซม์อยู่ 3 รูปแบบที่มีค่า pI แตกต่างกันคือ 4.3, 3.3 และ 2.9 โดยเอนไซม์ที่มีค่า pI เท่ากับ 4.3 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในก้านใบและลำต้น ขณะที่ในส่วนคอร์เท็กซ์ของรากจะพบทั้ง 3 รูปแบบในปริมาณใกล้เคียงกัน สำหรับเอนไซม์ที่มีค่า pI เท่ากับ 4.3 นั้นพบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 7.0-8.0 แต่ที่พีเอช 6.0 และ 9.0 การทำงานของเอนไซม์จะเหลือเพียงประมาณร้อยละ 30 และ 60 ตามลำดับ

Nambisan (1999) สกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากใบ เปลือกและน้ำยางของมันสำปะหลัง แล้วทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidaase จากการทดลองดังกล่าวพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งสกัดจากน้ำยางนั้นให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าจากเอนไซม์ที่สกัดได้จากส่วนอื่นๆถึง 300 เท่า และวิธีการสกัดเอนไซม์จากน้ำยางนั้นมีความสะดวกและเอนไซม์ที่ได้สะอาดกว่าจากการสกัดเอนไซม์จากส่วนอื่นๆ

3.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ร่วมกับเอนไซม์ลินามาเรส

การย่อยสลายลินามารินให้เป็นไซยาไนด์เป็นกระบวนการที่มี 2 ขั้นตอนด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 11 ในขั้นแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยา deglycosylation ของลินามารินโดยเอนไซม์บีต้า-กลูโคไซเดสที่เรียกกันทั่วไปว่าลินามาเรสให้เกิดเป็นอะซีโตนไซยาโนไฮดริน เอนไซม์ลินามาเรสนี้ยังสามารถย่อยสลายโลทอสตราลินได้อีกด้วย ขั้นต่อมาเป็นการสลายอะซีโตนไซยาโนไฮดรินให้กลายเป็นอะซิโตนและไซยาไนด์โดยเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส (Hughes, 1999 ; Vetter, 2000) แม้ว่าอะซีโตนไซยาโนไฮดรินจะสามารถเกิดการสลายตัวเมื่อพีเอชสูงมากกว่า 4.0 (McMahon *et al*., 1995) หรือ 5.5 (Selmar *et al*., 1987) ก็ตาม เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส ยังคงมีความสำคัญช่วยเร่งการเกิดไซยาไนด์ให้มากทันกับการตอบสนองต่อการรุกรานเนื้อเยื่อจากสัตว์และแมลง



ภาพที่ 11 การเกิดไซยาโนเจเนซิสจากลินามาริน
ที่มา: McMahon *et al.* (1995)

ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส (hydroxynitrile lyase E.C.4.1.2.10) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของไฮดรอกซีไนตริล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ให้กลายเป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์และอัลดีไฮด์หรือคีโตน เอนไซม์ชนิดนี้พบครั้งแรก

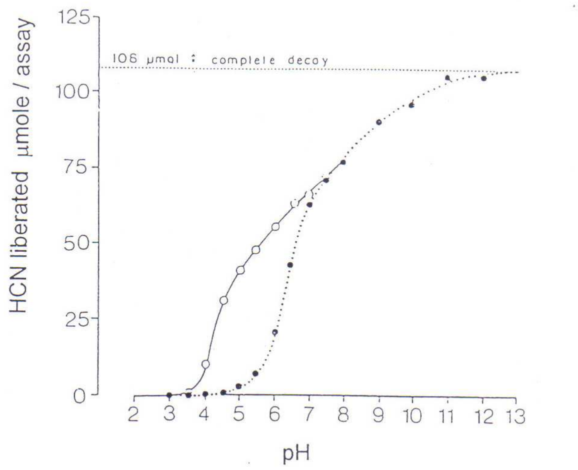
ในอัลมอลต์ (almond, Prunus amygdalus) และเรียกว่า อีมัลซิน (emulsin) นอกจากนี้ยังพบในข้าวฟ่าง (sorghum) ยางพารา มันสำปะหลัง และแมลงบางชนิด เอนไซม์นี้มีการศึกษากันมาก เนื่องจากในสภาวะที่มีไฮโดรเจนไซยาไนด์มากเกินพอ เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนไซยาไนด์เข้าไปยังอัลดีไฮด์หรือคีโตนในตำแหน่งทางสามมิติอย่างจำเพาะเกิดเป็นแอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริลที่มีสมบัติหมุนระนาบแสงโพลาไรต์ ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีบทบาทเป็นตัวเร่งชีวภาพในการสังเคราะห์สารออพติคัลแอ็กทิฟแอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในอุตสาหกรรมเคมีและเภสัชกรรม (Hughes, 1994)

Selmar *et al.* (1989)ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส ในปรากฏการณ์ไซยาโนเจเนซิส ในภาพที่ 12 ที่สภาวะพีเอชเป็นกรด ไซยาโนไฮดรินมีความเสถียร และการที่จะทำให้เกิดการสลายตัวจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส เมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลายจะมีผลทำให้องค์ประกอบต่างๆในแวคิวโอลและในไซโทพลาซึมผสมกันจนมีพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย (พีเอช 5.0-6.5) ซึ่งในสภาวะนี้ปฏิกิริยาในการแยกสลายของไซยาโนไฮดรินโดยตัวเองจะมีความเร็วต่ำ ดังนั้นเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนไซยาไนด์ออกมาให้ทันกับการตอบสนองเมื่อมีการทำลายเนื้อเยื่อพืช การแยกสลายไซยาโนไฮดรินจึงจำเป็นต้องอาศัยการเร่งโดยเอนไซม์ชนิดนี้ จากการศึกษาการบ่มตัวอย่างด้วยเอนไซม์ลินามาเรส และแอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอสจากยางพาราร่วมกันในสัดส่วนต่างๆกันเป็นเวลา 5 นาที ที่พีเอช 5.5 เพื่อตรวจสอบความเร็วของการเกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์ พบว่ามีเพียงร้อยละ 4 ของอะซีโตนไซยาโนไฮดรินซึ่งเกิดขึ้นจากการย่อยสลายลินามารินโดยเอนไซม์ลินามาเรส เท่านั้นที่มีการสลายตัวต่อไปด้วยตัวเอง ขณะที่การเติมเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอสต่อลินามาเรสในอัตราส่วน 4:8 จะเร่งการสลายไซยาโนไฮดรินได้ถึงร้อยละ 99

เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส ในพืชแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มี flavin adenine dinuleotide (FAD) เป็น Prosthetic group และกลุ่มที่ไม่มี FAD กลุ่มแรกนั้นพบอยู่ในเฉพาะตระกูล *Rosaceae* เช่น อัลมอลต์ (almond) เชอร์รี่ (cherry) พลัม (plum) แอปเปิล (apple) เป็นต้น การแยกเอา FAD ออกจะทำให้เอนไซม์สูญเสียการทำงาน ขนาดโมเลกุลจะมีความใกล้เคียงกันและเป็นไกลโคโปรตีน ส่วนตัวอย่างกลุ่มหลังนั้นพบในพืช เช่น ยางพารา มันสำปะหลัง ป่าน ข้าวฝ่าง เป็นต้น มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ในส่วน apoplast เช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5.0-6.6

บางชนิดอาจมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่แคบมากคือพีเอช 5.5 เช่น เอนไซม์จากป่าน (flax) เป็นต้น

White *et al.* (1998) ได้ศึกษาเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอสที่สกัดจากใบมันสำปะหลัง พบว่ามีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน เนื่องจากประกอบขึ้นจากจำนวนหน่วยย่อยที่แตกต่างกัน สำหรับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าที่ประมาณ 5.0 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเอนไซม์จะสูญเสียการทำงานเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทสูงๆจะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย



ภาพที่ 12 การสลายตัวของอะซีโตนไซยาโนไฮดรินภายใต้พีเอชต่าง ๆ

●- - - - -● : การสลายตัวโดยตัวมันเอง (ไม่มีการเติมเอนไซม์จากแหล่งอื่น)

0- - - - - 0 : การสลายตัวด้วยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส

ที่มา: Selmar (1989)

การศึกษาของ Chueskul (1996) พบว่าแหล่งที่ให้เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีไนตริลไลเอสมากที่สุดในมันสำปะหลัง คือ ส่วนก้านใบ (petiole) รองลงมาคือ ยอดอ่อน (shoot) เอนไซม์จากก้านใบนี้มีขนาดโมเลกุลตามธรรมชาติเท่ากับ 102,000 ดาลตัน หน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 25,600 ดาลตัน ดังนั้นคาดว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย สำหรับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 5.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพี

เอชที่เป็นด่าง (พีเอช 6.0-11.0) สารประกอบแอลกอฮอล์และคีโตนเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competition inhibitor) ขณะที่สารประกอบอัลดีไฮด์เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non- competition inhibitor) โดยที่สารประกอบในกลุ่มดังกล่าวที่มีคาร์บอน 4 อะตอมจะเป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงที่สุด

4. ความเป็นพิษและการกำจัดความเป็นพิษของไซยาไนด์

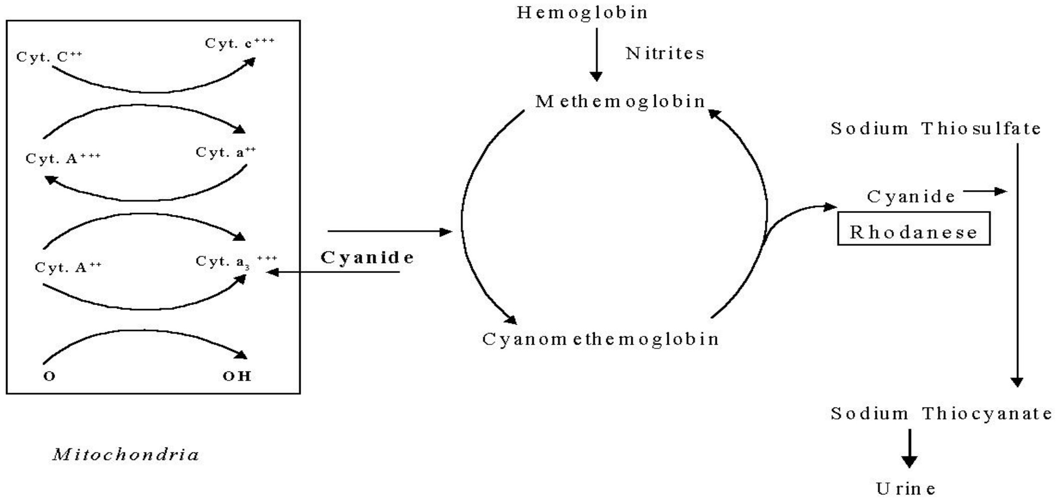
4.1 การกำจัดพิษไซยาไนด์ในสิ่งมีชีวิต

พืชที่สามารถสร้างไซยาไนด์ได้นั้นเก็บรักษาโครงสร้างไซยาไนด์ไว้ในรูปที่เสถียร คือ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะได้สารพิษ 2 ชนิดด้วยกันคือ ไซยาไนด์(HCN) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญในกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิต และอัลดีไฮด์หรือคีโตนซึ่งเป็นพิษโดยตรง ไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่เกิดขึ้นในพืชชนิดเดียวกันมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของพืช และยังแตกต่างกันออกไปในแต่ละต้น แม้ว่าจะเอามาจากส่วนเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ในส่วนรากมันสำปะหลังซึ่งมีปริมาณไซยาไนด์อยู่ระหว่าง 240-890 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไปจนถึง 1,040 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในใบ ความเข้มข้นระดับที่เป็นพิษจนถึงขั้นทำให้เกิดผลตายเฉียบพลันของไฮโดรเจนไซยาไนด์ในคน, แกะ, วัวควาย, หนู (mice), แมว, หนู (rat), และสุนัขมีค่าเท่ากับ 0.5-3.5, 2.4, 2.0, 3.7, 2.0, 0.5-10.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมตามลำดับ (Christensen, 1976)

การรับประทานพืชที่สร้างไซยาไนด์อย่างช้า ๆ หรือเคี้ยวเป็นเวลานานๆอาจไม่แสดงอาการความเป็นพิษของไซยาไนด์ออกมา แกะสามารถรับได้ 15-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เนื่องจากมีพฤติกรรมการกินตลอดทั้งวัน ในคนสามารถรับไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ 30-35 มิลลิกรัมต่อวันจากมันสำปะหลังในรูปอาหารพื้นบ้านที่มีชื่อเรียกว่าการิ (gari) ซึ่งปริมาณนี้คิดเป็นประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณที่ทำให้เกิดการตายเฉียบพลันในคนที่มีน้ำหนัก 70 กิโลกรัม เมื่อปริมาณที่ได้รับอยู่ในระดับต่ำที่ไม่อยู่ในระดับให้เสียชีวิต ทั้งนี้ในร่างกายมีกระบวนการกำจัดพิษไซยาไนด์จึงสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์กลุ่ม sulfurtransferase คือ Rhodanese (E.C. 2.8.1.1) หรือเรียกอีกชื่อว่า Thiosulfate-cyanide sulfur transferase ซึ่งพบได้ในตับและไมโตคอนเดรียของเซลล์ไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยไปเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอนุมูลไซยาไนด์กับหมู่ไธโอซัลเฟต (thiosulfate; $S_2O_3^{2-}$) เกิดเป็นไธโอไซยาเนต (Thiocyanate) โดยไธโอไซยาเนตนั้นจะไม่เป็นพิษและร่างกายจะขับออกมาในรูปของของเสียต่อไป (Lang, 1933) ดังวิถีในภาพที่ 13 ซึ่งสารไธโอไซ

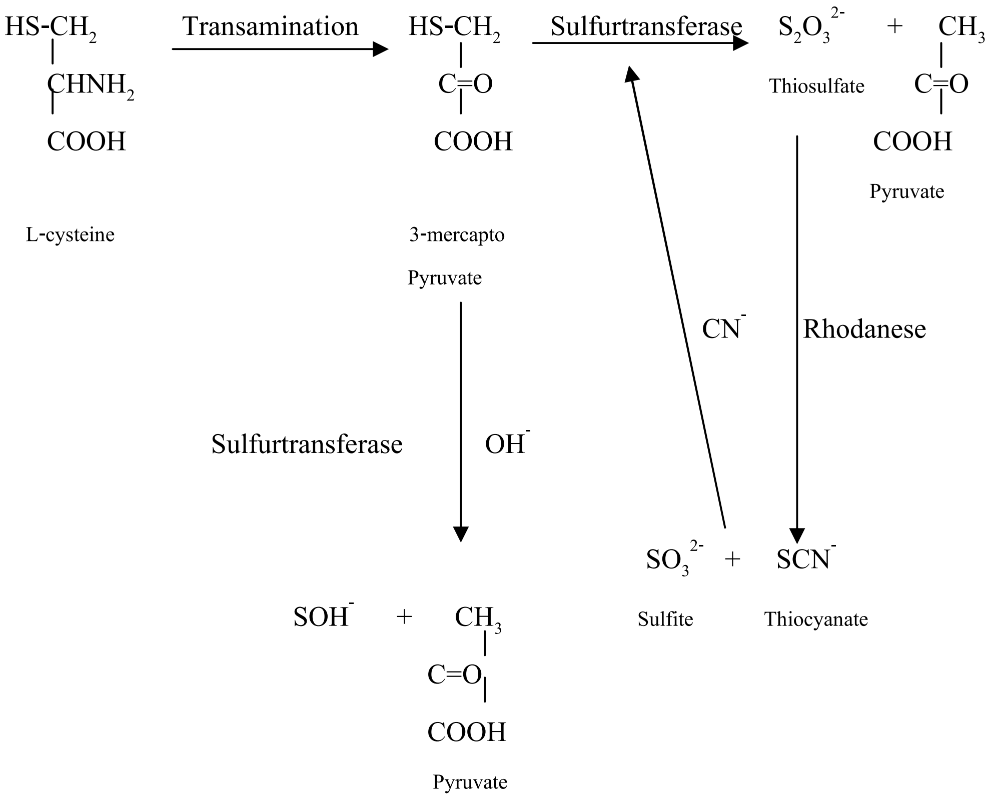
ยาเนตนี้สามารถตรวจพบได้ในซีรัม พลาสมา และสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนม น้ำตา น้ำลาย และปัสสาวะ (Blanco and Gorniak, 2003; Boxer and Rickards, 1952; Lundquist *et al.*, 1979; Haque and Bradbury, 1999b; Vesey *et al.*, 1999)

$$\underset{\text{Thiosulfate}}{S_2O_3^{2-}} + CN^- \xrightarrow{\text{Rhodanese}} \underset{\text{Thiocyanate}}{SCN^-} + SO_3^{2-}$$



ภาพที่ 13 การกำจัดพิษไซยาไนด์ โดยเอนไซม์ Rhodanese ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น Rhodanese จะเข้าทำปฏิกิริยากับกลุ่ม disulfide ที่กระจายอยู่ภายในร่างกาย ซึ่งเป็นไปตามกระบวนการ sulfur metabolism สำหรับการกำจัดพิษของไซยาไนด์ให้อยู่ในรูปของไธโอไซยาเนตนั้นร่างกายจะรับเอาซัลเฟอร์จากกรดอะมิโนกลุ่มที่มีซัลเฟอร์ในโครงสร้าง ได้แก่ เมไธโอนีน (methionine) และซิสเตอีน (cysteine) จากการศึกษาของ Meister (1953) นั้นรายงานว่า สาร 3-mercaptopyruvate ซึ่งได้จากกระบวนการ Transamination หรือ Deamination ของกรดอะมิโนซิสเตอีนนั้นจะเป็นสารซัลเฟอร์ตั้งต้นสำหรับกระบวนการกำจัดพิษไซยาไนด์ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 กระบวนการกำจัดพิษไซยาไนด์ ที่มีกรดอะมิโนซีสทิอีน(cysteine)เป็นแหล่งซัลเฟอร์

แม้ว่าไธโอไซยาเนตจะสามารถลดพิษของไซยาไนด์ได้ก็ตาม Goldstein และ Rieders (1953) ได้รายงานปรากฏการณ์ของเอนไซม์ Thiocyanate oxidase ในเม็ดเลือดแดง ที่สามารถเปลี่ยนไธโอไซยาเนตกลับไปอยู่ในรูปไซยาไนด์อีกครั้ง เพื่อปรับให้ระดับของสารทั้งสองในเลือดมีระดับที่สมดุลกัน กลไกดังกล่าวจึงเป็นผลกระทบที่เป็นอันตรายหากมีการรับปริมาณ (Dose) ของไซยาไนด์มากเกินพอดี

นอกจากนั้นการได้รับพิษภัยของไซยาไนด์จากอาหารยังคงเป็นปัญหาหลักในบางภูมิภาคของโลก เช่นทวีปแอฟริกา ในประเทศไนจีเรียตั้งแต่ปี ค.ศ.1989 เป็นต้นมาได้มีรายงานจำนวนมากกล่าวถึงการได้รับพิษไซยาไนด์อย่างเฉียบพลันและตายในเวลาไม่นานหลังจากได้รับประทานอาหารพื้นบ้านที่เรียกว่าการิ ผู้ป่วยมีอาการอาเจียนและปวดท้องทันทีหลังทานอาหาร จากนั้นเข้าสู่อาการโคม่าร่วมกับไตวายเฉียบพลัน และตายด้วยสาเหตุการทำงานของหัวใจและปอดล้มเหลว นอกจากนี้ชาวไนจีเรียยังปรากฏกลุ่มอาการที่เรียกว่า tropical ataxic neuropathy (TAN) ซึ่งปรากฏรอยโรคบนผิวหนัง เยื่อเมือก ในไขสันหลัง เส้นประสาทของการมองเห็นและการได้ยิน และที่

ปลายประสาท ซึ่งพบว่าสาเหตุเกิดจากปริมาณไธโอไซยาเนตในเลือดสูง แต่ถ้าระดับของไธโอไซยาเนตต่ำเกินไปก็เป็นสาเหตุของโรคความดันโลหิตสูงด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงต้องควบคุมให้อยู่ในระดับที่พอเพียงต่อร่างกาย นอกจากนั้นโรค Konzo เป็นอีกโรคหนึ่งที่เกิดจากการรับประทานมันสำปะหลังอย่างต่อเนื่อง โดยที่มันสำปะหลังนั้นไม่ได้ผ่านหรือผ่านกระบวนการกำจัดไซยาไนด์ได้ไม่เพียงพอ ทำให้ขาทั้งสองข้างเป็นอัมพาต (Rosling, 1996) ในมันสำปะหลังยังมีสารก่อโรคคอพอกอยู่ด้วย ซึ่งทำให้ผู้ที่มีอาการขาดธาตุไอโอดีนขาดธาตุนี้มากขึ้น โดยมีสาเหตุเกิดจากการที่สารไธโอไซยาเนตเข้ายับยั้งการรับสารประกอบไอโอไดด์ (Iodide) ของต่อมไทรอยด์ โดยสารไธโอไซยาเนตจะเข้าไปเร่งการหลั่งสารไอโอไดด์เร็วกว่าที่ต่อมไทรอยด์จะสามารถเข้ารับได้ ทำให้เกิดการขาดแคลนไอโอดีน (Iodine) วิธีการรักษาสามารถทำได้โดยเพิ่มปริมาณการรับธาตุไอโอดีนเข้าสู่ร่างกายให้มากขึ้น (Vetter, 2000)

4.2 การกำจัดปริมาณไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (Food and Agricultural organization/World Health organization, [FAO/WHO]) ได้กำหนดมาตรฐานระดับปริมาณไซยาไนด์ที่ปลอดภัยในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังไว้ใน Codex Alimentarius ดังตารางที่ 6 ขณะที่หัวมันสดของสายพันธุ์ที่มีรสขมอาจมีระดับไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์สูงถึง 1,500 มิลลิกรัมไซยาไนด์ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงเกินกว่าระดับที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค ดังนั้นการนำมันสำปะหลังมาบริโภคจึงต้องมีกระบวนการลดและกำจัดพิษไซยาไนด์อย่างมีประสิทธิภาพ Padmaja (1995) ได้รวบรวมข้อมูลงานวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับวิธีการที่ใช้ไว้ดังนี้

ตารางที่ 6 ปริมาณไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่กำหนดโดย Codex alimentarius

ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง	ปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ (มิลลิกรัมไฮโดรเจนไซยาไนด์ต่อกิโลกรัม)
ฟลาว (Flour)	< 10 (ต่อน้ำหนักแห้ง)
การิ (Gari)	< 2 (ต่อน้ำหนักแห้ง)
มันสำปะหลังชนิดหวาน (Sweet cassava)	< 50 (ต่อน้ำหนักสด)

4.2.1 การทำให้แห้ง (drying)

วิธีนี้เป็นที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถเพิ่มอายุการเก็บหัวมันได้ การให้ความร้อนเพื่อให้น้ำระเหยออกจากหัวมันสามารถทำได้โดยใช้การตากแดดหรืออบในตู้อบ หัวมันจะถูกลดขนาดให้เป็นแผ่นชิ้นก่อนไปทำให้แห้ง มีรายงานว่าการตากแดดให้ผลดีกว่าการอบในตู้อบ เนื่องจากแบบแรกจะช่วยให้มีช่วงเวลาของการสัมผัสกันระหว่างเอนไซม์ลินามาเรสกับไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์นานขึ้น ขณะเดียวกันยังคงรักษาน้ำซึ่งเป็นสับสเตรทที่สำคัญของเอนไซม์ไว้ได้นานขึ้นในหัวมันชิ้นแผ่นมันที่บางจะคงปริมาณไซยาไนด์ไว้ได้มากกว่าแผ่นหนา เนื่องจากเกิดการแห้งได้อย่างรวดเร็วทำให้ลดเวลาการสัมผัสกันของเอนไซม์และไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์

4.2.2 การหุงต้ม (boiling)

การลดลงของไซยาไนด์ในชิ้นแผ่นมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการต้ม ปริมาณของน้ำที่ใช้และขนาดของชิ้นมัน ปริมาณไซยาไนด์อิสระจะเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการต้มและลดลงในภายหลังเนื่องมาจากการระเหยไปในรูปของไฮโดรเจนไซยาไนด์ ขณะที่ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในน้ำจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการหุงต้ม ชิ้นมันที่ใส่ลงไปในน้ำเดือดพบว่าคงระดับไซยาไนด์ไว้มากกว่าชิ้นมันที่ใส่ลงในน้ำธรรมดาแล้วค่อยต้มให้เดือด และการต้มชิ้นมันขนาดเล็กลดปริมาณไซยาไนด์ได้ดีกว่าชิ้นมันขนาดใหญ่

4.2.3 การแช่ล้าง (soaking/leaching)

วิธีนี้ใช้กันมากในหลายพื้นที่ทั้งทางอเมริกาใต้และแอฟริกา การแช่น้ำช่วงชะล้างไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ออกจากหัวมันและมีผลเกี่ยวเนื่องทำให้เกิดการหมักและหัวมันยังอ่อนนุ่มขึ้น น้ำที่ซึมเข้าไปในหัวมันช่วยให้เกิดการย่อยสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ภายในหัวมัน นอกจากนี้ความอ่อนนุ่มของหัวมันยังช่วยลดแรงงานที่ใช้ในการขูดเนื้อมัน

4.2.4 การปอกเปลือก (peeling)

ขั้นแรกของวิธีต่างๆของการนำมันสำปะหลังมาบริโภคต้องเริ่มด้วยการปอกเปลือกเพื่อเอาส่วนคอร์เท็กซ์ของรากที่แข็งแยกออกจากส่วนพาเรนคิมา ส่วนเปลือกนั้นมักมีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่าเนื้อมันภายใน ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิถีทางที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไซยาไนด์ มีรายงานว่าสามารถลดได้ถึงร้อยละ 50 ของทั้งหมดที่มีอยู่ในหัวมัน

4.2.5 การหมัก (fermentation)

การหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์เป็นวิถีที่ทำกันมานานในทุกส่วนของโลกเพื่อพัฒนารสชาติและเนื้อสัมผัส เพิ่มคุณค่าทางอาหาร โดยเพิ่มพูนปริมาณโปรตีนและลดปัจจัยเสี่ยงจากสารพิษ นอกจากนี้ยังเพิ่มอายุการเก็บอันเป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก การเติมกล้าเชื้อจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดไซยาไนด์ระหว่างการหมักและยังช่วยลดระยะเวลาการหมัก ตัวอย่างเชื้อที่ได้มีการทดสอบและรายงานไว้ ได้แก่ *Brevibacterium sp. R312* กล้าเชื้อผสมของ *Lactobacillus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium sp.* และยีสต์ หลังจากหมักได้ระยะหนึ่งจะพบการลดลงของไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์พร้อมๆกับการเพิ่มขึ้นของไซยาไนด์อิสระ ซึ่งไซยาไนด์อิสระเกือบทั้งหมดสามารถกำจัดได้ในระหว่างการตากแดดแป้งหมัก บทบาทการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสภายในหัวมันเพิ่มขึ้นแค่ในช่วงท้ายของการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ซึ่งอาจเนื่องมาจากต้องมีช่วงเวลาให้น้ำที่แช่หัวมันเข้าแทรกซึมและชะเอาเอนไซม์ออกมา แต่เอนไซม์ก็ไม่สามารถทำงานได้เต็มที่เพราะพีเอชนั้นอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ขณะที่การหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อผสมจะเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ตั้งแต่ช่วงแรก ๆ ของการหมัก ซึ่งพีเอชช่วงนี้เอื้อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

การิ (gari) เป็นอาหารพื้นบ้านที่นิยมกันในทวีปแอฟริกาที่เตรียมจากการหมักมันสำปะหลังขั้นตอนเริ่มจากการล้าง ปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นแล้วนำไปหมักในถุงที่ทับด้วยก้อนหินเพื่อไล่น้ำออกเป็นเวลา 4 วัน ส่วนน้ำซึ่งมีไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ที่ละลายอยู่เป็นส่วนใหญ่จะถูกเททิ้ง นำส่วนที่เหลือในถุงไปผัดบนกะทะเหล็กร้อน 80-85 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้การิสีขาว หรือผัดกับน้ำมันซึ่งจะได้การิสีเหลืองทั้งสองชนิดจะมีกลิ่นเปรี้ยวจางๆเชื้อแบคทีเรียกลุ่มกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นเชื้อชนิดหลักที่พบระหว่างการหมัก ในช่วงสุดท้ายของการหมักทำให้

พีเอชต่ำลงจึงเป็นอุปสรรคต่อการลดปริมาณไซยาไนด์ เนื่องจากพีเอชต่ำทำให้ไซยาไนด์ที่อยู่ในรูปของไซยาโนไฮดรินมีความเสถียรขึ้น

4.2.6 การสกัดแป้ง

Arguedas and Cooke (1982) ได้ศึกษาปริมาณไซยาไนด์ตกค้างในแต่ละขั้นตอนของการผลิตแป้งมันสำปะหลังจากโรงงานที่ใช้กระบวนการโม่เปียกแล้วทิ้งแป้งให้ตกตะกอน พบว่าไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ในหัวมันเปลี่ยนไปเป็นไซยาไนด์อิสระระหว่างการโม่ ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมดในหัวมันที่มีอยู่ระดับ 400-680 ส่วนในล้าน ลดลงเหลือเพียง 1-4 ส่วนในล้านในผลิตภัณฑ์แป้งสุดท้าย การศึกษาสมดุลไซยาไนด์จากโรงงานในประเทศไทยแห่งหนึ่งที่มีกำลังการผลิต 200 ตันต่อวัน ด้วยปริมาณไซยาไนด์ในวัตถุดิบ 33 กิโลกรัมต่อวัน พบว่ามีปริมาณไซยาไนด์ในน้ำทิ้งถึง 30 กิโลกรัมต่อวัน โดยได้แป้งที่มีไซยาไนด์อยู่ในปริมาณ 0-1.4 ส่วนในล้านโดยน้ำหนักแห้ง (Sriroth และคณะ, 2000)

5. การนำเอนไซม์ลินามาเรสใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์เป็นการบ่งบอกถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง การวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์นั้นมีด้วยกันหลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 7 ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสมบัติของสารประกอบไซยาไนด์ที่ต้องการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารประกอบไซยาไนด์ในมันสำปะหลังนั้นประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (1.) การสกัดแยกสารประกอบไซยาไนด์ออกจากมันสำปะหลัง (2.) การไฮโดรไลซิสไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ไปเป็นรูปไซยาไนด์ และ (3.) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์นั้นมีวิธีการตรวจสอบ 2 วิธี คือการไตเตรทด้วยสาร $AgNO_3$ และการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาการเกิดสีของสาร เช่น pyridine/pyrazolone ซึ่งรียกว่า König reaction การตรวจวิเคราะห์สารประกอบไซยาไนด์โดยทั่วไปที่พบมาก 2 วิธีคือ การวิเคราะห์แบบการย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) และการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ไม่สูงเท่าการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ แต่การทำงานนั้นค่อนข้างยุ่งยากและความแม่นยำต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ ขั้นตอนการวิเคราะห์อาศัยหลักการการสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ด้วยกรดเข้มข้น 2 M H_2SO_4 ที่ความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที เกิดไซยาโนไฮดริน แล้วหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทำการสลายไซยาโนไฮดรินให้เป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์ด้วยสภาวะด่าง การคำนวณค่าปริมาณสารประกอบไซยาไนด์อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากการระเหยออกอย่างช้าๆของไฮโดรเจนไซยาไนด์

วิธีการวิเคราะห์ที่ได้ผลแม่นยำคือ การวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ (Enzymatic method) ซึ่งเป็นวิธีการที่วัดค่าสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา König reaction โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรสนั้นมีด้วยกัน 2 วิธีคือ วิธีออโตไลซิส (Autolysis) โดยเอนไซม์ลินามาเรสแบบ endogenous enzyme และวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยเอนไซม์ลินามาเรสแบบ exogenous enzyme โดยหลักการของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์คือ การสลายไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส เกิดไซยาโนไฮดรินแล้วปรับสภาวะเป็นด่างให้กับระบบ เพื่อเกิดเป็นไซยาไนด์ในขั้นตอนสุดท้าย สำหรับในวิธีการออโตไลซิสนั้นมีข้อด้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์ exogenous enzyme เนื่องจากวิธีออโตไลซิสจะสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะตัวอย่างสดที่เอนไซม์ลินามาเรสที่มีอยู่ภายในตัวอย่างยังไม่ถูกทำลาย และต้องใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์ในตัวอย่างนาน

ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงจะสามารถทำปฏิกิริยา König reaction ต่อไปได้ ดังนั้นเพื่อการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังต่างๆ จึงควรเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรสแบบ exogenous enzyme โดยมีหลักการดังนี้คือ การสกัดตัวอย่างด้วยกรดฟอสฟอริก/แอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งเอนไซม์ลินามาเรสในหัวมัน และเติมเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดได้ ซึ่งไซยาโนจินิคกลูโคไซด์จะถูกย่อยกลายเป็นไซยาโนไฮดรินและกลูโคส ต่อจากนั้นปรับพีเอชให้อยู่ในสภาวะเป็นด่างโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยไซยาโนไฮดรินจะเปลี่ยนรูปเป็นไซยาไนด์ ซึ่งอยู่ในสภาวะที่พีเอชมากกว่า 5.0 แล้วเติมสารที่ทำให้เกิดสี (Color reagent) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายคลอรามินทีและสารละลายไพริดีน/ไพราโซโลนเพื่อให้เกิดสี และทำการวัดค่าดูดกลืนแสง สารประกอบไซยาไนด์สามารถพบได้ 3 รูปแบบ คือ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside หรือ Bound cyanide) ไซยาโนไฮดริน (Cyanohydrin) และไซยาไนด์อิสระ (Free HCN) ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ที่อยู่ในรูปต่างๆสามารถทำได้ดังนี้

1. Total cyanogen หมายถึงสารประกอบไซยาไนด์ทั้งหมด ได้แก่ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside) ไซยาโนไฮดริน (Cyanohydrin) และไซยาไนด์อิสระ (Free HCN) โดยในการวิเคราะห์จะทำการสกัดด้วยสารสกัด มีการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสารประกอบกลูโคไซด์

2. Non-glycosidic cyanogen หมายถึงปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ที่ไม่ได้อยู่ในรูปของกลูดคไซด์ ได้แก่ ไซยาโนไฮดรินและไซยาไนด์อิสระวิเคราะห์โดยการสกัดด้วยสารสกัด และไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นในการวิเคราะห์จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลูโคไซด์เป็นไซยาโนไฮดริน แต่จะมีการปรับพีเอชเพื่อเปลี่ยนไซยาโนไฮดรินไปเป็นไซยาไนด์อิสระ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์อิสระทั้งหมด ซึ่งจะรวมทั้งไซยาโนไฮดริน และไซยาไนด์อิสระ

3. Free cyanide ได้แก่ไฮโดรเจนไซยาไนด์ วิเคราะห์โดยการควบคุมพีเอชของระบบให้น้อยกว่า 4.0 และไม่เติมเอนไซม์ ดังนั้นทั้งกลูโคไซด์และไซยาโนไฮดริน จะไม่มีการเปลี่ยนรูปไปเป็นไซยาไนด์อิสระดังนั้นปริมาณไซยาไนด์ที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นปริมาณไซยาไนด์อิสระที่มีอยู่ในระบบเท่านั้น

จากหลักการวัดปริมาณสารประกอบไซยาไนด์โดยการใช้เอนไซม์ โดยทำให้ไซยาไนด์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารทำให้เกิดสีที่สามารถวัดค่าได้ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของไซยาไนด์ไปอยู่ในรูปที่วิเคราะห์ได้เป็นชนิดที่ไม่มีความเสถียร สามารถแตกตัวและระเหยได้ง่าย

จากการวิเคราะห์ข้างต้น สามารถนำไปคำนวณหารูปต่างๆของไซยาไนด์ ได้ดังนี้

ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside)	= Total cyanogen - Non-glycosidic cyanogen
ไซยาโนไฮดริน (Cyanohydrin)	= Non-glycosidic cyanogen - free cyanide
ไซยาไนด์อิสระ (Free cyanide)	= Free cyanide (HCN)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในวิธีการต่างๆ

วิธีการ	Autolysis (Bradbury *et al.,* 1994)	Enzymatic Hydrolysis (Cooke, 1978)	Enzymatic Hydrolysis (Essers *et al.,* 1993)	Acid Hydrolysis (Bradbury *et al.,* 1991)	Acid Hydrolysis (Bradbury *et al.,* 1994)	Immobilized enzyme electrochem. (Yeoh, 1992)
Hydrolytic Method	Autolysis	เติม Linamarase	เติม Linamarase	Acid Hydrolysis 100 ^{O}C	Acid Hydrolysis 100 ^{O}C	Linamarase In polymer disc
Cyanide Determination	Pyridine/ pyrazolone or pyridine/ barbituranante	Pyridine/ pyrazolone	Isonicotinate/ dimethyl- barbituranante	pyridine/ barbituranante	Isonicotinate/ barbituranante	Cyanide electrode
Sensitivity	ดี	ดี	ดี	ดี	ดี	ดีเล็กน้อย
Specificity for cyanide	ดีมาก	ดีมาก	ดีมาก	ดีมาก	ดีมาก	ดี
ความแม่นยำ	เกือบ 100 %	ดี	ดี	ดี	ดี	ยอมรับได้
ความสะดวก	ง่ายมาก	ง่าย	ง่าย	ง่ายเล็กน้อย	ง่าย	ง่าย
ทางเคมี						
1. ราคา	ต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	ปานกลาง
2. ความสามารถของประเทศกำลังพัฒนา	ดี	ยาก	ยาก	ดี	ดี	ยากมาก
เครื่องมือ	Spectro- photometer	Spectro- photometer	Spectro- photometer	Spectro- photometer	Spectro- photometer	pH/m V meter cyanide electrode polymer discs

ที่มา: Bradbury *et al.* (1994)

6. การศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง

การศึกษาเทคนิคการทำเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์จากมันสำปะหลัง มีรายงานการศึกษาดังนี้

Cooke *et al.* (1977) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนเปลือกของหัวและเนื้อเยื่อคอร์เท็กซ์ของมันสำปะหลัง ตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 แล้วผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ขนาด 4.5 x 15 เซนติเมตร ชะคอลัมน์แบบ linear gradient ด้วย NaCl ในสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM พีเอช 5.5 อัตราการไหล 110 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากการทดลอง พบว่ามีการชะเอนไซม์หลุดจากคอลัมน์ 2 ชนิดด้วยกัน ซึ่งหลังจากตรวจสอบกับสับสเตรท pNPG แล้วนำ peak ที่ 2 ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sephadex G-150,G-200 โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 5.5 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 60,000 ดาลตัน เอนไซม์ที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์มากขึ้นเท่ากับ 350 เท่าและ % recovery สุดท้ายเท่ากับร้อยละ 35 หลังผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟ

Eksittikul and Chulavatnatol (1988) แยกเอนไซม์ลินามาเรส จากส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง 3 ส่วน คือ ลำต้น, ก้านใบ และ เปลือกของหัวมัน โดยการปั่นผสมกันทั้ง 3 ส่วน ตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 65 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sepharose 6B ขนาด 2 x 55 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 5.5 ผลที่ได้คือสามารถแยกเอนไซม์ลินามาเรสออกมาเป็น single protein ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63,000 ดาลตัน โดยเอนไซม์มีไอโซไซม์ด้วยกัน 3 ชนิด คือ pI 4.3, 3.3 และ 2.9 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเท่ากับ 16.4 เท่า

Yeoh (1988) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสเปรียบเทียบจากส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง 3 ส่วน คือส่วนของใบ, เปลือก และคอร์เท็กซ์จากหัวของมันสำปะหลัง ทำการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sephacryl S-300 ขนาดคอลัมน์เท่ากับ 33 x 2.5 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วย Sodium citrate buffer

ความเข้มข้น 100 mM พีเอช 6.0 ศึกษาผลของกิจกรรมเอนไซม์ต่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง 3 ส่วน พบว่า ส่วนของใบและเปลือกของมันสำปะหลังให้ผลของกิจกรรมสูงกว่าส่วนหัวมัน และศึกษาผลของการไฮโดรไลซิสพันธะบีต้าของสับสเตรทต่างๆที่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่ม β-glucosidase พบว่า การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เกิดได้ดีกับสับสเตรทกลุ่ม β-monoglycosides แต่เกิดกิจกรรมได้เล็กน้อยถึงไม่เกิดเลยในกลุ่มสับสเตรท β-diglycosides โดยสับสเตรทที่ให้ผลกิจกรรมสูงสุดคือ pNP-β-glycosidase และ pNP-β-fucosidase มีค่าเท่ากับ 917 Units (nkat/mg protein)ในส่วนที่สกัดได้จากใบมันเท่ากัน ส่วนกลุ่มสับสเตรท cyanogenic β-monoglucosides ทำปฏิกิริยาได้ดีกับสับสเตรทลินามารินคือมีค่าเท่ากับ 150 Units (nkat/mg protein) ส่วนสับสเตรทตัวอื่นเกิดได้น้อยมากถึงขั้นไม่เกิดกิจกรรมเลย

Mkpong *et al.* (1990) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากใบมันสำปะหลัง ตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sephadex G-200 ขนาด 2.5 x 50 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 8.0 โดยแยกเอนไซม์ลินามาเรสได้ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,000 ดาลตัน เอนไซม์มีค่า specific activity มากขึ้นจากเดิม 100 เท่า

Nok and Ikediobi (1990) สกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนคอร์เท็กซ์ของหัวมันสำปะหลัง ตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 40-60 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sephadex G-200 ขนาด 2.0 x 80 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.5 ปรากฏผลของโปรตีนเป็น single peak แล้วต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-Sephadex ขนาด 2.0 x 40 เซนติเมตร ชะคอลัมน์แบบ linear gradient ด้วย NaCl ความเข้มข้น 20-250 mMในสารละลายบัฟเฟอร์ acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.5 พบว่ามีการชะเอนไซม์หลุดจากคอลัมน์ 2 ชนิดด้วยกันเป็น Linamarase A และ B พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้มีลักษณะเดียวกัน และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,000 ดาลตัน เอนไซม์มีค่า specific activity มากขึ้นจากเดิม 148 และ 116 เท่า ตามลำดับ

Sermsuvityawong *et al.,*(1995) ศึกษาโครงสร้างของลินามาเรสที่ถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์จากส่วนของ ก้านใบ ลำต้น และเปลือกของรากมันสำปะหลัง พบว่าลินามาเรสมีขนาดโมเลกุล 63,000 ดาลตันโดย sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

โดยเอนไซม์ได้จากคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sepharose 4B ขนาด 2.5 x 80 เซนติเมตร ชะด้วย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 mM พีเอช 5.5

จากการศึกษาของ Elias *et al.* (1997) ทำการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางมันสำปะหลังเช่นกัน โดยผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 และผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาด 1.5 x 10 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 สามารถแยกเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 70,000 ดาลตัน ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE และมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 72,000 ดาลตัน เมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sephadex G-150 ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้เท่ากับ 8.1 เท่า

7. เทคนิคการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (enzyme purification) คือ การแยกเอนไซม์จากโปรตีนอื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ โดยที่สมบัติของเอนไซม์จะเป็นปัจจัยสำคัญที่พิจารณาถึงวิธีการที่จะใช้ในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ สมบัติเหล่านั้นได้แก่ สมบัติในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ ขนาดของโมเลกุล, ประจุไฟฟ้า, ค่า pI, ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา และระดับพีเอชและอุณหภูมิที่เอนไซม์คงตัว รวมทั้งความจำเพาะกับสับสเตรทบางชนิดด้วยวิธีการที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มีหลายวิธี และมักใช้หลายวิธีประกอบกัน วิธีเหล่านั้น ได้แก่

7.1 วิธีการตกตะกอน

การตกตะกอนเป็นกรรมวิธีที่นิยมใช้สำหรับการแยกโปรตีนซึ่งใช้เป็นขั้นต้นของกระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์ ความสามารถในการละลายของโปรตีนขึ้นกับการกระจายตัวของโปรตีน เนื่องจากโปรตีนประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่ที่ผิวรอบนอกของโมเลกุลโปรตีน นอกจากนี้โมเลกุลของโปรตีนยังมีประจุที่ผลักกัน ทำให้โมเลกุลอยู่ห่างกันไม่สามารถรวมกันเป็นกลุ่มก้อนและตกตะกอนได้ เมื่อใดที่มีปัจจัยที่มีผลลดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำ (protein-water interaction) หรือเพิ่มปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interaction) ได้ก็จะทำให้โมเลกุลของโปรตีนรวมกันเป็นกลุ่มก้อน และตกตะกอน การแยกเอนไซม์ด้วยวิธีการตกตะกอนมีหลายวิธี ได้แก่

7.1.1 การตกตะกอนโดยอาศัยค่า pI ของเอนไซม์

เมื่อโมเลกุลของโปรตีนมีความสมดุลระหว่างประจุบวกและประจุลบมีผลให้ประจุสุทธิของโปรตีนมีค่าเท่ากับศูนย์ พีเอชที่มีผลให้ประจุสุทธิของโปรตีนเท่ากับศูนย์ นี้เรียกว่า isoelectric point (pI) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะและแตกต่างกันไปสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ในช่วงที่สารละลายมีค่าพีเอชน้อยกว่าค่า pI ประจุบนโมเลกุลโปรตีนนั้นจะมีประจุเป็นบวก และเกิดแรงผลักกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน จึงทำให้โปรตีนชนิดนั้นละลายน้ำได้ เมื่อปรับพีเอชของ

สารละลายให้มีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีน จะเกิดการสมดุลระหว่างประจุบวกและประจุลบ ทำให้ประจุสุทธิมีค่าเท่ากับศูนย์ โมเลกุลของโปรตีนจะรวมกลุ่มกันแล้วตกตะกอน

ในทำนองเดียวกันเมื่อปรับพีเอชมากกว่าค่า pI ของโปรตีน ประจุบนโมเลกุลโปรตีนจะเป็นลบ โมเลกุลจะผลักกัน โดยมีโมเลกุลน้ำมาล้อมรอบ ค่าการละลายจะเพิ่มขึ้น วิธีนี้จะเหมาะกับการแยกเอนไซม์ที่มีค่า pI ใกล้เคียงกันกับค่าพีเอชที่เอนไซม์คงตัวอยู่ได้ เมื่อตกตะกอนเอนไซม์จากโปรตีนชนิดอื่นที่มีค่า pI แตกต่างออกไปและเอนไซม์ไม่เสียสภาพ

7.1.2 การตกตะกอนด้วยเกลือที่มีความเข้มข้นสูง

สารละลายเกลือนั้นมีค่า ionic strength สูง จะดูดซับโมเลกุลของน้ำอิสระ (free water) และน้ำที่เกาะกับส่วนที่ชอบน้ำของโปรตีน (bound water) ไว้ เมื่อค่า ion strength สูงจนดึงน้ำส่วนที่ล้อมโปรตีนไว้หมด ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนจะดูดซับกันทำให้โมเลกุลของโปรตีนรวมกลุ่มกัน แล้วตกตะกอน เกลือที่ใช้ในการตกตะกอนซึ่งเป็น multi-charge anion ได้แก่ เกลือฟอสเฟต และเกลือซัลเฟต ซึ่งจะมีผลให้เกิดการตกตะกอนได้ดีกว่าอนุมูลที่เป็น univalent ion เช่น เกลือคลอไรด์ เป็นต้น

เกลือที่นิยมใช้ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การตกตะกอนด้วยเกลือที่มีความเข้มข้นนั้นเป็นวิธีการแยกโปรตีนวิธีหนึ่ง ที่อาศัยหลักการการลดความสามารถในการละลายของโปรตีน โปรตีนต่างชนิดกันก็มีความสามารถในการตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน ดังนั้นจึงยังมีโปรตีนชนิดหนึ่งตกตะกอน และยังคงมีโปรตีนบางชนิดที่ยังคงละลายอยู่ในสารละลาย

7.1.3 การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอธานอลและอะซีโตนมีผลให้เกิดการลดค่า dielectric constant ของน้ำ ทำให้สมบัติการเป็นตัวทำละลายละลายลดลง และส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนจะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของตัวทำละลาย เมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น การดูดซับระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำจะลดลงมีผลให้การดูดซับระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น โมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ใกล้กันจะรวมกลุ่มกันแล้วตกตะกอน เอนไซม์ที่มีโมเลกุล

ขนาดใหญ่ จะสามารถตกตะกอนที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายต่ำกว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่มีประจุไฟฟ้าผิวโมเลกุลจำนวนมากกว่า ทำให้มีโอกาสในการดูดซับกันมาตกตะกอนได้ง่ายกว่า การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นี้สามารถแบ่งช่วงการตกตะกอนตามความเข้มข้นของตัวทำละลายได้เช่นเดียวกับการตกตะกอนด้วยเกลือเรียกว่า organic solvent fractionation

การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายมีข้อดีคือ ตัวทำละลายบางชนิดเช่น เอธานอล จะไม่แข็งตัวที่ 0 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถลดอุณหภูมิของการตกตะกอนได้ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำโครงสร้างของโปรตีนจะมีความเสถียร และตัวทำละลายจะเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำเฉพาะที่ผิวของโมเลกุลโปรตีนเท่านั้น (intramolecular hydrophobic interaction) แต่ที่อุณหภูมิสูงโครงสร้างของโปรตีนจะเกิดรอยแตกหักบนผิวโมเลกุล ตัวทำละลายจะแทรกเข้าไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในโมเลกุล (intermolecular hydrophobic interaction) ทำให้พันธะภายในโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลายและโปรตีนจะสลายตัว

7.1.4 การตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยการทำให้โปรตีนเหล่านั้นเสียสภาพ

เนื่องจากโปรตีนที่ต้องการบางชนิดมีสมบัติที่แตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ จึงนำสมบัติที่แตกต่างกันนี้มาใช้ในการแยกโปรตีน โดยการทำให้โปรตีนที่ไม่ต้องการเสียสภาพ และจับตัวกันเป็นตะกอนแยกออกจากสารละลายโปรตีนที่ต้องการ ได้แก่ สมบัติในการทนกรด สมบัติในการทนอุณหภูมิสูง และสมบัติในการคงตัวในตัวทำละลาย เป็นต้น การที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้นต้องคำนึงถึงความคงตัวของโปรตีนที่ต้องการด้วย

7.2 วิธีโครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatograph)

โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุ เป็นเทคนิคทางโครมาโตกราฟที่ใช้สำหรับการแยกสารที่มีประจุ หรือสารที่สามารถแตกตัวได้หรือสารที่สามารถเกิด interaction กับหมู่ไอออนได้ แรงยึดเหนี่ยวของสารกับ stationary phase เป็นแรงไฟฟ้าสถิตย์ที่เกิดขึ้นระหว่างประจุที่ต่างชนิดกัน ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอออนแสดงได้ดังนี้

Cation exchange : $X^{+} + R^{-}Y^{+} \leftrightarrow Y^{+} + R^{-}X^{+}$

Anion exchange : $X^{-} + R^{+}Y^{-} \leftrightarrow Y^{-} + R^{+}X^{-}$

เมื่อ X = ไอออนที่ต้องการแยก

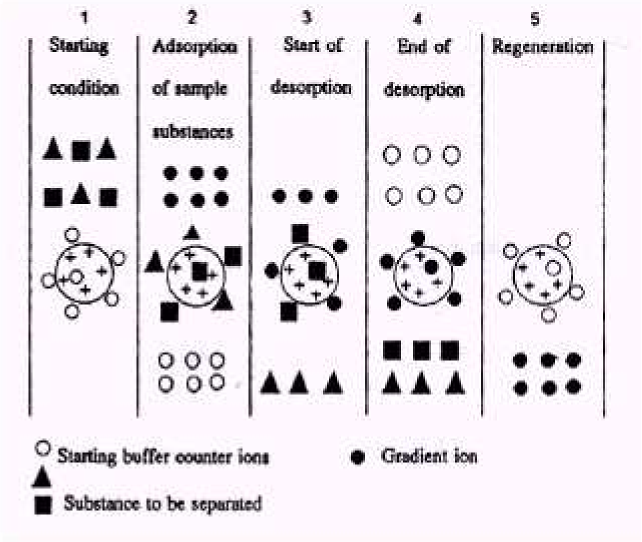
Y = counter ion

R = ไอออนบน stationary phase

การแยกสารด้วยวิธีโครโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุเป็นกระบวนการ reverse adsorption โดยไอออนของโปรตีนจะดูดซับบนเรซินที่มีประจุตรงข้ามและแยกไอออนของโปรตีนออกจากเรซินที่ได้โดยการผ่านตัวชะ อัตราเร็วของการชะจะแตกต่างกันขึ้นกับความแรงของการยึดเหนี่ยวของโปรตีนกับเรซิน

โมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีทั้งประจุบวกและลบ อยู่บนผิวของโปรตีนประจุรวมของโปรตีนขึ้นกับจำนวนของกลุ่มที่ให้ประจุบวกและลบซึ่งแปรตามค่าพีเอช ค่าพีเอชที่ทำให้โปรตีนมีประจุบวกเท่ากับประจุลบเรียกว่า isoelectric point (pI) โปรตีนส่วนมากจะมีค่า pI ระหว่างพีเอช 5.0 และ 9.0 โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นลบที่ค่าพีเอช มากกว่า pI ขณะที่พีเอชต่ำกว่าค่า pI จะมีประจุรวมเป็นบวก ดังนั้นโครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุสำหรับการแยกโปรตีนจะขึ้นกับประจุบนผิวของโปรตีน

counter ion ที่เกี่ยวข้องกับ stationary phase และกลุ่มที่ให้ประจุในโปรตีนจะเป็นไอออนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพื่อให้โปรตีนจับกับ stationary phase ชนิดของ counter ion แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และกลุ่มที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบกับโปรตีน ขั้นตอนการทำงานของโครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุ แสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุ
ที่มา: Pharmacia (1991)

จากภาพที่ 15 แสดงขั้นตอนในการแลกเปลี่ยนประจุดังนี้

ขั้นที่ 1 สภาวะที่ตัวแลกเปลี่ยนประจุอยู่ในภาวะที่สมดุลกับสารละลายเริ่มต้นในคลอลัมน์ โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกล้อมรอบด้วย counter ion

ขั้นที่ 2 เริ่มใส่ตัวอย่างลงในคลอลัมน์สารตัวอย่างที่มีประจุเดียวกับ counter ion ของสารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้น เข้าไปแทนที่ในส่วน counter ion ที่ล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุอยู่ ทำให้ counter ion เดิมถูกชะออกจากคลอลัมน์ ส่วนโปรตีนตัวอย่างถูกยึดจับไว้ที่ผิวเรซิน ส่วนสารใดที่มีประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นแบบเดียวกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือเป็นกลางทางไฟฟ้าก็จะถูกชะผ่านลงมา

ขั้นที่ 3 สารตัวอย่างถูกแยกออกจากคลอลัมน์ เนื่องจากมีการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเปลี่ยนไป เรียกว่าการทำให้เกิดความแตกต่างของช่วงพีเอช (buffer gradient) เกิดการเปลี่ยนแปลงของความแรงประจุสุทธิบนโมเลกุลโปรตีนมีค่าลดลง ทำให้แรงยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุลดลงทำให้สารตัวอย่างหลุดออกมา

ขั้นที่ 4 สารที่ต้องการแยกถูกชะออกจากคลอลัมน์ ส่วนบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุก็ถูกล้อมรอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดใหม่ที่ใช้ทำ buffer gradient

ขั้นที่ 5 เป็นการชะไล่บัฟเฟอร์ในข้อที่ 4 ออกจากคลอลัมน์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้นมาทำการชะไล่ ทำให้บริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุกลับมาล้อมรอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมอีก

8. การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส

อิเล็กโตรฟอรีซิสเป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์โปรตีนที่มีประจุต่างกันในสนามไฟฟ้า โปรตีนบางชนิดมีประจุบวก บางชนิดมีประจุลบและบางชนิดไม่มีประจุ ซึ่งประจุของโปรตีนจะเกิดจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน, หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆ ที่อยู่ในแขนข้าง (side chain) ของโปรตีนแต่ละชนิดที่ค่าพีเอชหนึ่งๆ เทคนิควิธีการแยกโมเลกุลให้บริสุทธิ์นี้ใช้หลักการการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนผ่านสนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุและขนาดของโมเลกุลต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้ โปรตีนที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ และโปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก แต่เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมกับการแยกสารละลายเอนไซม์ที่ยังมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่หลายชนิด เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการแพร่กระจายเข้ามาซ้อนทับกัน ทำให้ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้โดยง่าย ซึ่งวิธีการแยกโปรตีนด้วยวิธี electrophoresis ที่นิยมมากที่สุดคือ วิธี sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis หรือเรียกย่อว่า SDS-PAGE

SDS-PAGE เป็นการแยกโปรตีนผ่านโครงร่างเจลที่เป็นร่างแหที่เกิดขึ้นระหว่าง acrylamide และ N,N'- methylenebisacrylamide โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น ammonium persulfate และ N,N,N'N'-tetramethylenediamine (TEMED) โดย TEMED จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจาก persulfate ทำให้เกิดการโพลีเมอร์ไลซ์ขึ้น สาร sodium dodecyl sulfate (SDS) นั้นมีคุณสมบัติเป็น detergent จะทำปฏิกิริยาตัดย่อยพันธะไฮโดรเจนของโปรตีน แยกโปรตีนออกเป็นแต่ละละสายโพลิเปปไทด์หรือ subunit และเนื่องจากที่ SDS เป็นประจุลบที่แรงจึงดูดดึงโปรตีนให้เป็นประจุลบทั้งหมด โปรตีนที่เคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกผ่านตามรูพรุนของเจล โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าที่มีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่กับ

โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน จะทำให้สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ศึกษาได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 น้ำยางของมันสำปะหลัง

1.2 เอนไซม์ลินามาเรสที่ใช้ในทางการค้า (Linamarase™) จาก BDH Chemicals, England

1.3 กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid)

1.4 ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Trisodium phosphate, Na_3PO_4)

1.5 กรดอะซิติก (Acetic acid)

1.6 *p* – nitrophenol (pNP)

1.7 โพลิไวนิลโพลิไพโรลิโดน (Polyvinylpolypyrrolidone)

1.8 แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$)

1.9 *p* – nitrophenyl - β - D – glucoside (PNPG)

1.10 ลินามาริน (Linamarin)เตรียมจากห้องปฏิบัติการ

1.11 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3)

1.12 bovine serum albumin

1.13 โซเดียม โพแทสเซียม ทาร์เตรท (Sodium potassium tartrate)

1.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

1.15 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate)

1.16 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

1.17 น้ำยา Folin – ciocalteau

1.18 เอธานอล (Ethanol)

1.19 ไพริดีน (Pyridine)

1.20 บีสไพราโซโลน (Bispyrazolone)

1.21 3 – methyl – 1 – phenyl – 5 – pyrazolone

1.22 คลอรามีน ที (Chloramine T)

1.23 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)

1.24 อะคริลาไมด์ (Acrylamide)

1.25 N,N'-methlylene-bis-acrylamide (Bis)

1.26 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

1.27 Sodium dodecylsulfate (SDS)

1.28 Glycerol

1.29 Bromophenol blue

1.30 2-mercaptoethanol

1.31 Trichloroacetic acid

1.32 Coomassie brilliant blue R-250

1.33 Tris base

1.34 Glycine

1.35 Sodium chloride

1.36 Ammonium persulphate

1.37 Phosphorylase b

1.38 Ovalbumin

1.39 Myoglobin

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงที่มีระบบทำความเย็น (Refrigerated ultracentrifuge)

2.2 เครื่องกวนผสมด้วยแรงแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer)

2.3 ชุดกรอง Amicon ultrafiltration และแผ่นกรองขนาดรูสำหรับขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตัน

2.4 ตู้ทำความเย็น

2.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

2.6 สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.7 อ่างน้ำร้อน (Water bath)

2.8 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Autopipet)

2.9 เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.10 เครื่องเขย่าผสมสารในหลอดทดลอง (Vortex mixer)

2.11 ตู้ดูดควัน (Fume hood)

2.12 คิวเวต (Cuvette)

2.13 อุปกรณ์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose

2.14 อุปกรณ์สำหรับวิธี SDS – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE)

2.15 เครื่องเขย่าด้วยเสียง (Sonicate)

วิธีการ

1. การสกัดและเตรียมเอนไซม์ลินามาเรส จากน้ำยางของมันสำปะหลัง

เตรียมเอนไซม์ตัวอย่างจากน้ำยางของมันสำปะหลัง 4 ตัวอย่างตาม ภาพที่ 16 แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ , ปริมาณโปรตีน และ ขนาดโมเลกุลโดยวิธี SDS – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) ร่วมกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

เอนไซม์ดิบ (ข้อ 1.1)

(Crude enzyme)

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอน
ด้วย 60 % $(NH_4)_2SO_4$
(ข้อ 1.2)

เ อนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมา
โตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ
DEAE-cellulose
(ข้อ 1.3)

ภาพที่ 16 การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลัง

1.1 การเตรียมเอนไซม์ดิบ (crude enzyme)

สกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของต้นมันสำปะหลังโดยดัดแปลงจากวิธีของ Haque and Bradbury (1999a) คือ นำส่วนน้ำยางมาปั่นละลายร่วมกับสารละลาย phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 ที่แช่เย็น อัตราส่วนน้ำยางต่อสารละลายบัฟเฟอร์ คือ 1 ต่อ 9 เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษ Whatman No.1 นำส่วนใสที่ได้ไปเติม Dowex 2x-8 (25% w/v) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที และทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นโดยชุดกรอง Amicon ultrafiltration นำสารละลายเอนไซม์เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสให้เข้มข้นด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 60

สกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนน้ำยางของต้นมันสำปะหลังขั้นตอนตามข้อ 1.1 หลังกรองเอนไซม์ด้วย Whatman No.1 นำเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Elias *et al.* (1997) นำส่วนใสที่ได้ไปเติม Dowex 2x-8 (25% w/v) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที เทตะกอนทิ้งนำส่วนใสด้านบนไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 แล้วแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นโดยชุดกรอง Amicon ultrafiltration ที่ติดตั้งแผ่นกรองสำหรับขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันลอดผ่านได้ นำสารละลายเอนไซม์ส่วนใสเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ได้แก่การนำเอนไซม์ที่ได้ไปหาขนาดโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และใช้วิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า

1.3 การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE-cellulose

สกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนน้ำยางของต้นมันสำปะหลังขั้นตอนตามข้อ 1.1 หลังกรองเอนไซม์ด้วย Whatman No.1 นำเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ

Elias *et al.* (1997) นำส่วนใสที่ได้ไปเติม Dowex 2x-8 (25% w/v) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที เทตะกอนทิ้งนำส่วนใสด้านบนไปทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นในสารละลาย phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 โดยชุดกรอง Amicon ultrafiltration ที่ติดตั้งแผ่นกรองสำหรับขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันลอดผ่านได้ ทำสารละลายเอนไซม์ส่วนใสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์ที่บรรจุ DEAE-cellulose (ภาคผนวก ก ข้อ 3) คอลัมน์มีขนาด คือ 1.6 x 10 เซนติเมตร แล้วชะโปรตีนที่ไม่ดูดซับกับเรซินด้วยสารละลายละลาย phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 จนโปรตีนที่ไม่ยึดติดกับเรซิน ออกมาจนหมด แล้วจึงชะโปรตีนชนิดที่ยึดติดกับเรซินด้วย สารละลาย phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 0.5 M ที่ 8 องศาเซลเซียส ในลักษณะเป็น linear gradient ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เป็น 5 เท่าของปริมาตร bed volume โดยให้อัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ลินามาเรสและวัดปริมาณโปรตีนด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน รวบรวมส่วนใสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ได้แก่ ขนาดโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และใช้วิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส

2.1 สับสเตรท *p* – nitrophenyl - β - D – glucoside (pNPG)

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสนั้น ใช้วิธีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase โดยดัดแปลงจากวิธีของ Toyobo enzyme (1977) โดยใช้ *p* – nitrophenyl - β - D – glucoside (pNPG) เป็นสับสเตรท ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ บ่มสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย Acetate buffer 0.1 M พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสับสเตรท pNPG 20 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายเจือจางของเอนไซม์ตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ขณะเดียวกันต้องมีการเตรียมวัดค่าการดูดแสงของหลอดสารละลายเปล่า (blank) ซึ่งเป็นสารละลายผสมที่เติมโซเดียมคาร์บอเนต และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเติม

สารละลายเจือจางของเอนไซม์ตัวอย่าง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คือ หน่วยต่อมิลลิลิตร (โดย 1 หน่วย (unit) หมายถึง การเกิดขึ้นของ *p*-nitrophenol (pNP) 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด) คำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้

$$\text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์} = \frac{\text{(ผลลัพธ์การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดแสง) x จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน pNP x เวลาของปฏิกิริยา}}$$

โดยที่ผลลัพธ์การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดแสงคำนวณจากค่าการดูดแสงของตัวอย่างลบด้วยผลรวมของค่าการดูดแสงของสารละลายเปล่าที่ปราศจากเอนไซม์และที่ปราศจากสับสเตรท เวลาของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 15 นาที และกราฟมาตรฐาน pNP เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ pNP กับค่าดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

2.2 สับสเตรทลินามาริน (Linamarin)

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสนั้น ใช้วิธีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase โดยดัดแปลงจากวิธีของ O'Brien *et al.*(1999) โดยใช้ลินามารินที่สกัดจากเปลือกมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก ข้อ 6) เป็นสับสเตรท ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ สับสเตรทลินามารินความเข้มข้น 25 mM ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีจุกปิด จากนั้นเติมสารละลายที่มี Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 7.0 ลงไป 0.4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 จำนวน 2.8 มิลลิลิตรผสมเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้เกิดสีโดยการเติมสารละลาย Chloramine T (0.5%น้ำหนักโดยปริมาตร) 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย Pyridine/ pyrazolone (0.2 กรัม Bis- pyrazolone และ 1.0 กรัม 3-methyl-1-phenyl-5-pylazolone ใน Pyridine 200 มิลลิลิตร) 0.8 มิลลิลิตรในตู้ดูดควัน เขย่าผสมให้เข้ากัน เกิดปฏิกิริยาสารละลายเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสีชมพูม่วง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรเทียบกับหลอดสารละลายเปล่าที่ใช้สารสกัดที่ใช้สกัดไซยาไนด์แทนสับสเตรท คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์คือหน่วยต่อมิลลิลิตร (โดย 1 หน่วย หมายถึง การปลดปล่อย

ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) 1 ไมโครกรัมต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด) สามารถคำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้

กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ = $\frac{\text{(ผลลัพธ์การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดแสง) x จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน HCN x เวลาของปฏิกิริยา}}$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้วิเคราะห์โดยวิธีของ Hartree-Lowry (1972) ด้วยสารเคมี Folin-Ciocalteu (ภาคผนวก ก ข้อ 5) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยการเจือจางเอนไซม์ให้เหมาะสมด้วย Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารเคมี เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม Folin-Ciocalteu reagent เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งไว้ 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้ phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 เป็น blank คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ Bovine serum albumin 25 – 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีน

4. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิค SDS – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยมีบัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้ดังนี้ running gel, stacking gel, sample apply buffer และ electrode buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 4)

นำเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบจำนวนโปรตีนในสารละลายมาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยให้มีปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เอนไซม์ที่ใช้ศึกษามีดังนี้คือ เอนไซม์ดิบ (crude enzyme),เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose เพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™) วิธีการเตรียมตัวอย่าง คือนำสารละลายเอนไซม์มาผสมกับ sample buffer ใน

อัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นทำการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 4 นาที นำเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ใส่ลงในตำแหน่งสำหรับตัวอย่างต่อกระแสไฟฟ้าให้กระแสเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่อยู่ในส่วนของ running gel แล้วหยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) เคลื่อนที่เกือบถึงปลายสุดของ running gel แล้วย้อมสีแผ่นเจลด้วยสีย้อมโปรตีน coomassie brilliant blue R-250 (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ล้างสีออกด้วย destaining solution จนแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธี Electrophoresis ชนิด SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบระยะการเคลื่อนที่ของตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน SDS-Molecular weight maker ชุด BenchMark™ Protein Ladder ของบริษัท Invitrogen สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ถึง 220,000 ดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 15 ชนิด คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์ โดยหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนแต่ละชนิดและเอนไซม์ต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Rf)

5. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส

ศึกษาสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ได้แก่ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือ เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ และเอนไซม์ทางการค้า ตามวิธีของ Bunmasiri (2004) โดยอ้างอิงวิธีการวัดกิจกรรมด้วยวิธีของ Toyobo enzymes (1997)

5.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์

ในการศึกษานี้ จะใช้สับสเตรทคือสารละลาย pNPG 20 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใน Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.0 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านการเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลินามาเรส

5.2 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว นำเอนไซม์ที่บ่มมาทำให้เย็นทันที โดยแช่เอนไซม์ไว้ในอ่างน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำเอนไซม์ดังกล่าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เอนไซม์เจือจางโดยสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 6.0 และโดยใช้ pNPG 20 mM เป็นสับสเตรท

5.3 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 6.0 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสับสเตรท pNPG 20 mM ที่เตรียมจากบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช ต่างๆ ได้แก่ Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 และ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 วัดพีเอชสุดท้ายของสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสในเวลา 15 นาที

5.4 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

นำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่แยกได้ปริมาตร 0.1มิลลิลิตร ผสมกับ Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 และ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ด้วย Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.0 หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ pNPG 20 mM เป็นสับสเตรท

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์

นำเอนไซม์ตัวอย่างและทางการค้ามาใช้วิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด (Total cyanide) โดยวิธีของ O' Brien และคณะ (1991) โดยตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ประกอบไปด้วย แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) ฟลาวมันสำปะหลัง (Cassava flour) หัวมันสำปะหลังสด (Fresh cassava turber) และหัวมันสำปะหลังต้ม (Boiled cassava root peeled) ซึ่งเป็นตัวอย่างทางการค้าและเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ นำค่าปริมาณไซยาไนด์ที่ได้มาประมวลผลทางสถิติ

6.1 การสกัดไซยาไนด์ในตัวอย่าง

การสกัดไซยาไนด์ทั้งหมด (Total cyanide) ทำโดยใช้สารละลายผสม (สารสกัด) ที่มี 25% เอธานอลละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์กรดฟอสฟอริก ปั่นผสมตัวอย่างในรูปของแห้ง 30 กรัม หรือรูปของสด 50 กรัมในสารละลายผสม 100 มิลลิลิตรและ 150 มิลลิลิตร ตามลำดับ ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 1.30 นาที จากนั้นกรองแยกเอาน้ำสกัดโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บน้ำสกัดไว้ในหลอดทดลองที่มีจุกปิดและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6.2 การวิเคราะห์ไซยาไนด์ในตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์จะใช้น้ำสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีจุกปิด จากนั้นเติมสารละลายที่มี Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 7.0 ลงไป 0.4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาเกิดขึ้น โดยเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 จำนวน 2.8 มิลลิลิตรผสมเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้เกิดสีโดยการเติมสารละลาย Chloramine T (0.5%น้ำหนักโดยปริมาตร) 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย Pyridine/ pyrazolone (0.2 กรัม Bis- pyrazolone และ 1.0 กรัม 3-methyl-1-phenyl-5-pylazolone ใน Pyridine 200 มิลลิลิตร) จำนวน 0.8 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสารละลายใสเป็นสีชมพูม่วง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรเทียบกับสารละลายเปล่าที่ใช้สารสกัดที่ใช้สกัดไซยาไนด์แทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณค่าปริมาณไซยาไนด์ในหน่วยส่วนในล้านส่วนด้วยสมการต่อไปนี้

เทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่เตรียมจากสารโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ความเข้มข้น 0 – 250 ไมโครโมล

$$\text{ปริมาณไซยาไนด์} = \frac{\text{B x C x อัตราการเจือจางของตัวอย่าง x 100}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน HCN x A x (100 – M)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักของตัวอย่าง หน่วยเป็นกรัม B คือ ปริมาตรของสารที่ใช้สกัด หน่วยเป็นมิลลิลิตร C คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ M คือร้อยละของความชื้น ค่าปริมาณไซยาไนด์ที่ได้เป็นค่าแสดงถึงปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด ซึ่งรวมปริมาณไซยาไนด์ในรูปต่างๆทั้ง 3 รูป คือ ไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenicglucoside) ไซยาโนไฮดริน (cyanohydrin) และไซยาไนด์อิสระ (free cyanide)

7. การวางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธีทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 4x5 แฟคทอเรียลที่ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (4x5 factorial in randomized complete block design) ประกอบด้วยปัจจัย (factor) เอนไซม์ลินามาเรส 4 ระดับ และตัวอย่างวิเคราะห์ไซยาไนด์ 5 ระดับ วิเคราะห์ความแตกต่างโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

8. สถานที่ทำการวิจัย

หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปแป้งมันสำปะหลังและแป้ง สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. ระยะเวลาในการวิจัย

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2549 และสิ้นสุดในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2551

ผลและการวิจารณ์

1. การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรส

1.1 การเตรียมเอนไซม์ดิบ (crude enzyme) จากน้ำยางของมันสำปะหลัง

ในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ดิบจากน้ำยางมันสำปะหลังนั้นเป็นขั้นตอนที่เตรียมได้ง่ายและสะดวกกว่าการเตรียมเอนไซม์จากแหล่งอื่นของมันสำปะหลังเช่น ใบ ก้านใบ ลำต้น และเปลือก เป็นต้น เนื่องจากแหล่งดังกล่าวนั้นจะมีปัญหาจากการเจือปนของสารประกอบต่างๆ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และคลอโรฟิลล์ เป็นต้น ซึ่งอาจรบกวนการแยกเอนไซม์หรือการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยสับสเตรท pNPG นั้นจะถูกรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิก ที่มีปะปนอยู่ในน้ำยางของมันสำปะหลัง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นจะพบได้ในทุกส่วนของมันสำปะหลัง โดยพบมากที่สุดที่ส่วนของเปลือกนอก (rind) โดยสภาวะที่มีออกซิเจนนั้นเอนไซม์พอลีฟีนอล ออกซิเดส (Polyphenol oxidase) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ที่มีอยู่ในมันสำปะหลังจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์สารพอลีฟีนอลเกิดเป็นสารประกอบในรูป Phenoxide ion ซึ่งจะทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้นในมันสำปะหลัง โดยสารประกอบ Phenoxide ion นั้นสามารถพบได้จากกระบวนการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยสับสเตรท pNPG เช่นกัน โดยอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสเกิดเป็นกลูโคสและ pNP ซึ่งเป็นสารประกอบในรูป Phenoxide ion นั่นเอง ดังนั้นการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์จึงมีปัญหาจากการรบกวนของ Phenoxide ion ซึ่งมีอยู่ภายในน้ำยางนั้นเอง

จากสาเหตุดังกล่าวจึงมีต้องมีการกำจัดสารสารประกอบฟีนอลิก ออกจากน้ำยางมันสำปะหลัง โดยการใช้สารดักจับที่เรียกว่า Dowex 2x-8 resin (Bio-rad) ซึ่งจะช่วยในการกำจัดการรบกวนการวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วย pNPG ต่อไป

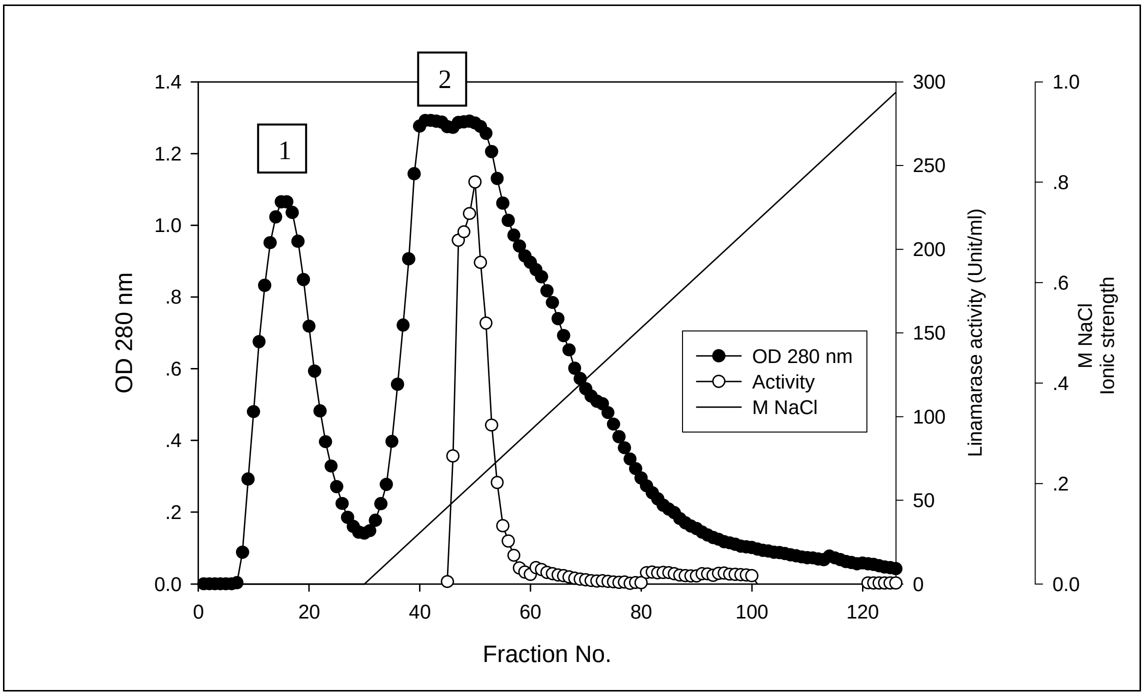
1.2 การทำเอนไซม์ลินามาเรสให้เข้มข้นด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ดิบ (crude enzyme) ที่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการแยกเอนไซม์บริสุทธิ์จะมีปริมาณมาก ในการเตรียมเอนไซม์จึงนิยมลดปริมาตรของเอนไซม์ดิบโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพราะวิธีนี้จะช่วยให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น และยังสามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ดิบบางส่วนออกได้ด้วย เนื่องจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จะทำโดยการตกตะกอนเป็นช่วงความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ เพราะฉะนั้นในแต่ละช่วงความเข้มข้นต่างๆของเกลือจะมีโปรตีนต่างชนิดกันตกตะกอนลงมา ทำให้แยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกันได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจะตกตะกอนเมื่อใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 และร้อยละผลได้ (% recovery) เท่ากับ 52

ซึ่งในการศึกษาของ Elias *et al.* (1997) นั้นได้ทำการเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสที่ผลิตได้จากน้ำมันยางสำปะหลังเข้มข้นด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 และพบว่าเอนไซม์มีร้อยละผล (% recovery) ได้เท่ากับ 52 เช่นกัน

1.3 การแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลังด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

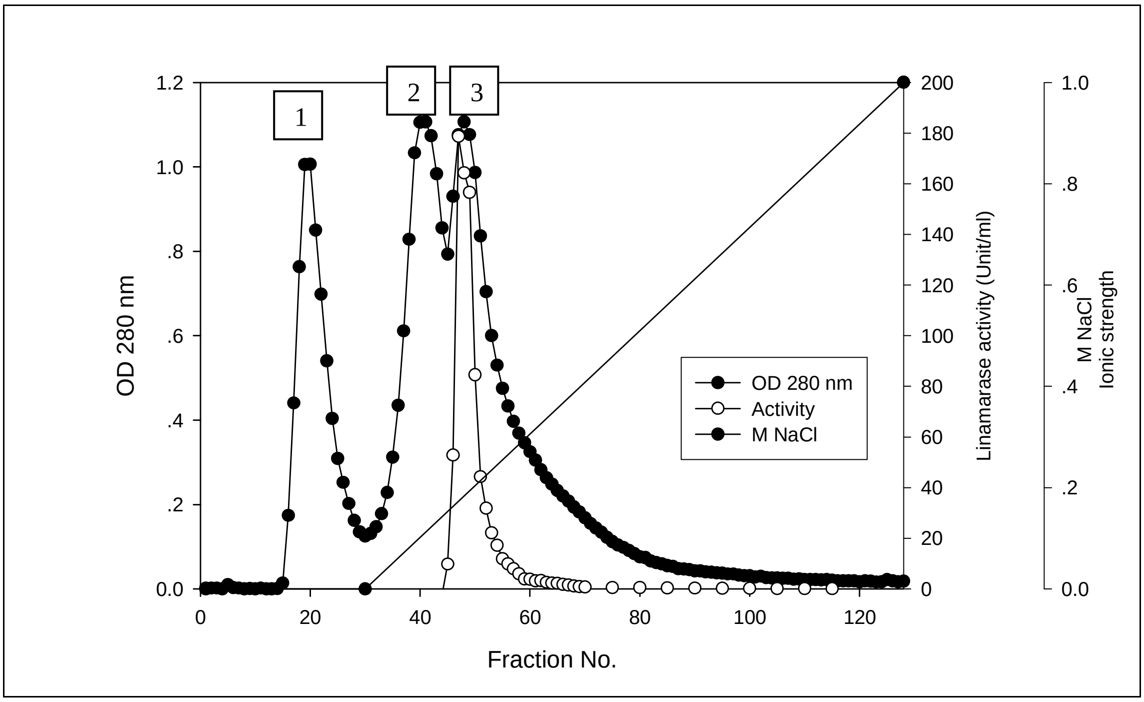
ในการแยกเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟประเภท anion exchange ชนิด DEAE-cellulose นั้นจะนำเอนไซม์ดิบที่ผ่านการ dialysis ด้วยเครื่อง Amicon ultrafiltration และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้เป็นบัฟเฟอร์ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 แล้วมาแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีขนาด bed volume เท่ากับ 1.6 x 10 เซนติเมตรใช้ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 ในการสร้างความสมดุล (equilibrium) ภายในคอลัมน์ และชะโปรตีน (elution buffer) ที่ไม่เกาะในคอลัมน์ด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 จนกว่าจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้เท่ากับศูนย์ และใช้บัฟเฟอร์เดียวกันที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0–1.0 M ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร bed volume และให้ไหลผ่านคอลัมน์แบบ linear gradient โดยให้อัตราไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งในการศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในช่วงแรกนั้น (ภาพที่ 17) พบว่า เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่าสามารถแยกโปรตีนได้ 2 ส่วน คือ 1 และ 2 เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีลินามาริน (linamarin) เป็นสับสเตรท พบว่าพีคที่ 1 เป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่สามารถเกาะอยู่ในคอลัมน์ได้ (void volume) ส่วนพีคที่ 2 นั้นจะเห็นว่ามีพีคของกิจกรรมเอนไซม์อยู่หนึ่งพีค ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสอยู่ แต่ยังมีส่วนของปรตีนที่เก็บรวบรวมได้ ที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงให้เห็นว่ายังไม่สามารถแยกให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ จึงทำการปรับเปลี่ยนสภาวะในการทำบริสุทธิ์ใหม่เพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น



ภาพที่ 17 ลักษณะของกิจกรรมและโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมัน สำปะหลัง เมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ขนาด bed volume เท่ากับ 1.6 x 20 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0-1.0 M อัตราการไหลของสารละลายภายในคอลัมน์ เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อหลอด

จากผลการศึกษาข้างต้น ดังนั้นในการแยกเอนไซม์จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ เพื่อทำให้สามารถแยกเอนไซม์ดีขึ้น จากอัตราการไหลเดิมคือ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ได้เป็น 3 ส่วน เอนไซม์ในส่วนของพีคที่ 2 และ 3 นั้นแยกออกจากกันได้มากขึ้นกว่าเดิม ดังแสดงไว้ในภาพที่ 18 แต่เอนไซม์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์พอ จึงทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที นอกจากนั้นมีการปรับช่วงความเข้มข้นของเกลือให้อยู่ในช่วงที่แคบลงจากเดิม คือจากช่วงความเข้มข้นเกลือ NaCl เท่ากับ 0–1.0 M เป็น 0–0.5 M แล้วดำเนินการขั้นตอนต่างๆตามเดิม คือ ใช้ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 แล้วมาแยกบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีขนาด bed volume เท่ากับ 1.6 x 10 เซนติเมตรใช้ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 ในการสร้างความสมดุล (equilibrium) ภายในคอลัมน์ และชะโปรตีน (elution buffer) ที่ไม่เกาะในคอลัมน์ด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 จนวัดค่าการดูดกลืนแสง

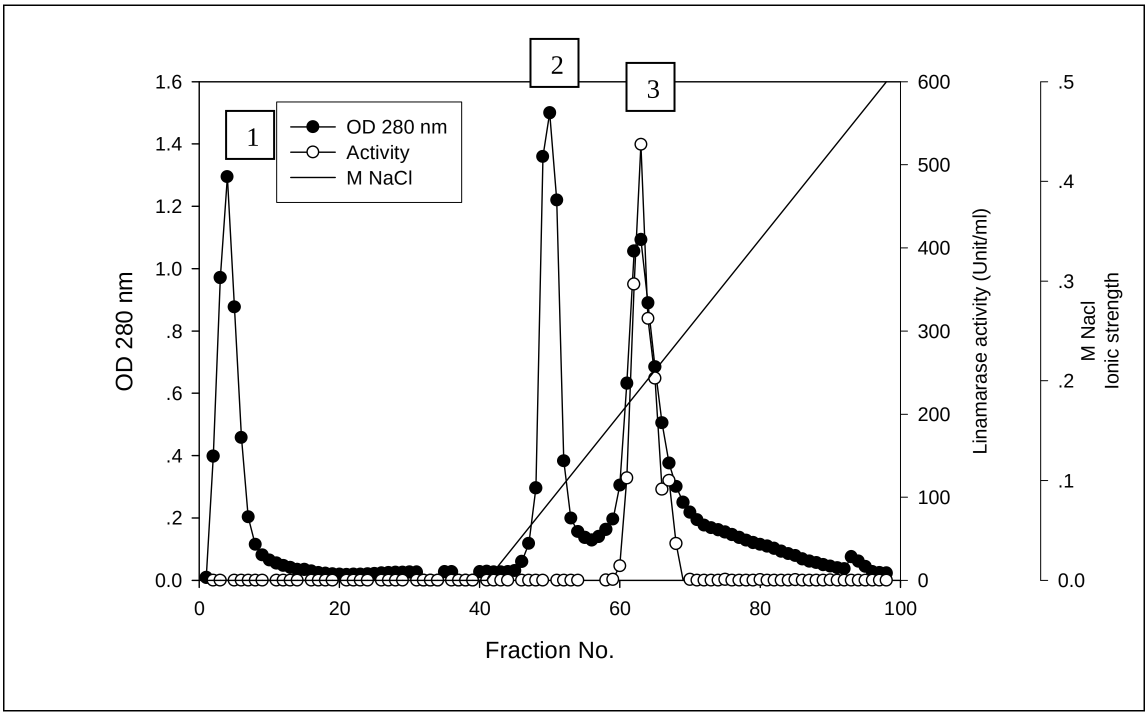
ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเท่ากับศูนย์ และใช้บัฟเฟอร์เดียวกันที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 1.0 M ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร bed volume และให้ไหลผ่านคอลัมน์แบบ linear gradient ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าเอนไซม์มีบางส่วนถูกชะออกมาในส่วนของ void volume พร้อมกับบัฟเฟอร์ในช่วงการชะแรกและบางส่วนยึดเกาะอยู่กับคอลัมน์ DEAE-cellulose และจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อทำ linear gradient ด้วยสารละลาย NaCl



ภาพที่ 18 ลักษณะของกิจกรรมและโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลัง เมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ขนาด bed volume เท่ากับ 1.6 x 20 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0-1.0 M อัตราการไหลของสารละลายภายในคอลัมน์ เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อหลอด

จากภาพที่ 19 ซึ่งจากการปรับอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถแยกโปรตีนได้ 3 ส่วน และสามารถแยกเอนไซม์ออกมาจากคอลัมน์ได้จากเอนไซม์ดิบเริ่มต้นที่ยึดจับด้วยเรซิน และจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยสับสเตรทลินามาริน พบว่าโปรตีนที่พบในส่วนที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาอยู่ในหลอดลำดับที่ 63 – 66 จะมีกิจกรรมของ

เอนไซม์เมื่อทดสอบด้วยลินามาริน โดยเอนไซม์ที่แยกได้ในส่วนที่ 3 นี้มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 31 มิลลิกรัม มีกิจกรรมของเอนไซม์รวมเท่ากับ 1,963.23 หน่วย และมีค่า specific activity เท่ากับ 63.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2.98 เท่า (ตารางที่ 8) จากงานวิจัยพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสมีค่า pI เท่ากับ 4.3 ดังนั้นในสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เอนไซม์จะมีประจุเป็นลบ จึงสามารถดูดซับหรือแลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ DEAE cellulose ซึ่งเป็นเจลชนิด anion exchange หรือแลกเปลี่ยนประจุลบ แสดงว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ผลิตได้มีประจุเป็นลบในสารละลายที่มีพีเอช 6.0



ภาพที่ 19 ลักษณะของกิจกรรมและโปรตีนของเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลัง เมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ขนาด bed volume เท่ากับ 1.6 x 20 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0 - 0.5 M อัตราการไหลของสารละลายภายในคอลัมน์ เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 4.5 มิลลิลิตรต่อหลอด

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลัง ด้วยวิธีการต่างๆ

Types of linamarase	Protein (mg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg)	Fold of Purification (Times)	% Recovery
1. Crude enzyme	8.67	184.49	21.28	-	100
2. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate dialyzed	7.43	191.01	25.71	1.21	52
3. DEAE-cellulose puified	1.00	63.33	63.33	2.98	21
4. Linamarase purified ™	0.27	3.81	14.11	-	-

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางมันสำปะหลังด้วยวิธีต่างๆ จากตารางที่ 8 พบว่าขั้นตอนการแยกเอนไซม์จะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการตกตะกอนด้วยเกลือมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ดิบ 1.21 เท่า แต่มีค่าความบริสุทธิ์ต่ำกว่าการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ซึ่งมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ดิบ 2.98 เท่า

Cooke *et al.* (1977) ศึกษาการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนเปลือกของหัวและเนื้อเยื่อคอร์เท็กซ์ของมันสำปะหลัง โดยการตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 แล้วผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ขนาด 4.5 x 15 เซนติเมตร แล้วนำพีคที่ 2 มาผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโต กราฟชนิด Sephadex G-150,G-200 โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 5.5 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60,000 ดาลตัน เมื่อตรวจขนาดด้วยคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟชนิด Sepharose 6B โดยเอนไซม์ที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์มากขึ้นเท่ากับ 351 เท่าหลังผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟ

Eksittikul and Chulavatnatol (1988) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง 3 ส่วน คือ ลำต้น, ก้านใบ และ เปลือกของหัวมัน โดยการปั่นผสมกันทั้ง 3 ส่วน ตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 65 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีชนิด Sepharose 6B ขนาด 2 x 55 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 5.5 สามารถแยกเอนไซม์ลินามาเรสออกมาเป็น single protein ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63,000 ดาลตัน เอนไซม์มีไอโซไซม์ 3 ชนิด คือ pI 4.3, 3.3 และ 2.9 และมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเท่ากับ 16.4 เท่า

Mkpong *et al.* (1990) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากใบมันสำปะหลัง โดยการตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 แล้วผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีชนิด Sephadex G-200 ขนาด 2.5 x 50 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 8.0 สามารถแยกเอนไซม์ลินามาเรสที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,000 ดาลตัน และมีค่า specific activity มากขึ้นจากเดิม 100 เท่า

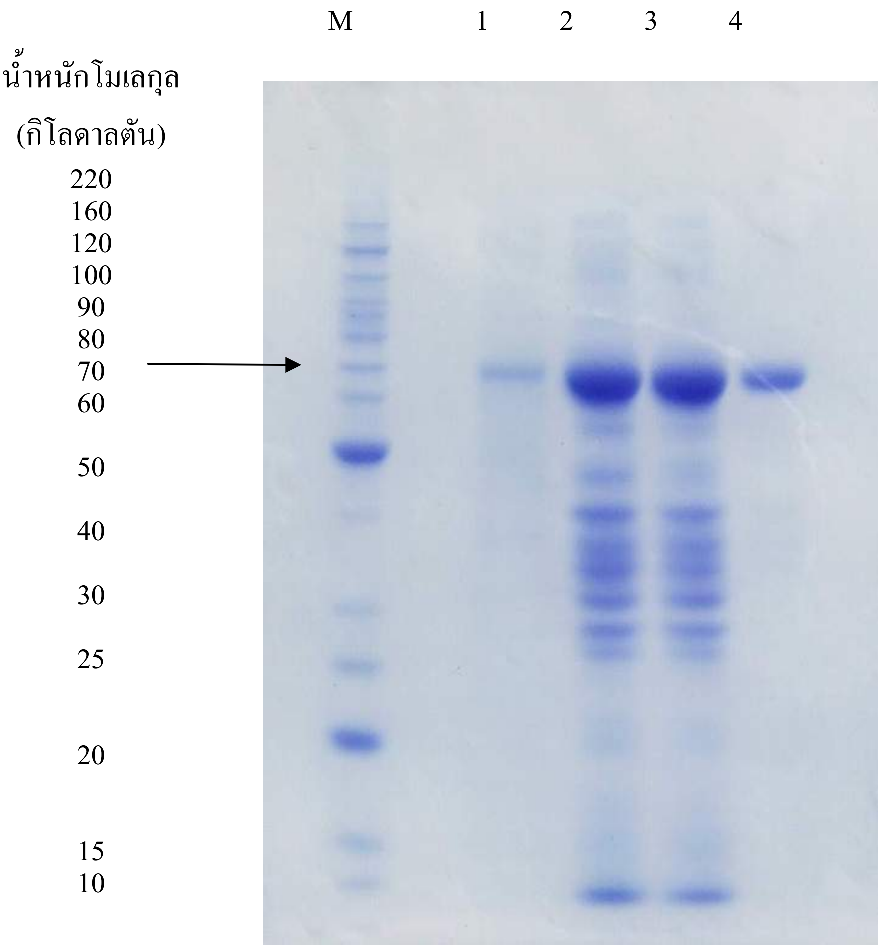
Elias *et al.* (1997) ทำการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางมันสำปะหลังเช่นกัน โดยผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 และผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาด 1.5 x 10 เซนติเมตร โดยบัฟเฟอร์คือ Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 6.0 สามารถแยกเอนไซม์ลินามาเรสได้เพียงชนิดเดียว โดยเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70,000 ดาลตัน เมื่อตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 8.1 เท่า

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางมันสำปะหลังนั้นให้ค่าความบริสุทธ์เพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งอื่นๆของมันสำปะหลัง ซึ่งจะมีค่าความบริสุทธิ์หลังจากผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟสูงกว่าเอนไซม์ดิบมาก สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องมาจากการเจือปนของสารประกอบพวกฟีนอล และคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในส่วนของใบ ลำต้น ก้านใบ ราก และเปลือกของมันสำปะหลังนั้นเอง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสดิบที่สกัดได้จากน้ำยางมันสำปะหลังนั้นสะอาดกว่าเอนไซม์ลินามาเรสดิบจากส่วนอื่นๆของมันสำปะหลัง แต่ในน้ำยางของมันสำปะหลังจะมีสิ่งปนเปื้อนที่รบกวนวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนต่างๆของมันสำปะหลังจะรบกวนการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ใช้สับสเตรท pNPG จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเอนไซม์ลินามาเรส (Cooke *et al.* (1977), Eksittikul and Chulavatnatol (1988), Mkpong *et al.* (1990) และ Elias *et al.* (1997)) พบว่ามีขั้นตอนการกำจัดสารประกอบฟีนอลในการศึกษาของ Eksittikul and Chulavatnatol (1988) ในขณะที่งานวิจัยอื่นที่สกัดเอนไซม์ในส่วนใบ เปลือก ราก ลำต้น และก้านใบซึ่งไม่ผ่านการกำจัดสารประกอบฟีนอลนั้นจะให้ค่าโปรตีนที่สูงมาก โดยเมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยของ Cooke *et al.* (1977) และ Eksittikul and Chulavatnatol (1988) ซึ่งสกัดเอนไซม์จากส่วนเปลือกของหัวมันเช่นกัน พบว่ามีค่าโปรตีนของเอนไซม์ดิบเท่ากับ 4,350 และ 243 มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการกำจัดสารประกอบฟีนอลแล้วนั้นค่าที่อ่านได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นค่าที่ได้จากโครงสร้างของโปรตีนเท่านั้น จึงเป็นสาเหตุให้ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสจากงานวิจัยทั้งสองที่ได้เป็น 351 และ 16.4 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Nambisan (1999) ได้ทำการเปรียบเทียบเอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากน้ำยางนั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนใบและเปลือกถึง 300 เท่า แสดงให้เห็นว่าน้ำยางเป็นแหล่งของเอนไซม์ลินามาเรสที่สำคัญน่าจะเป็น

2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

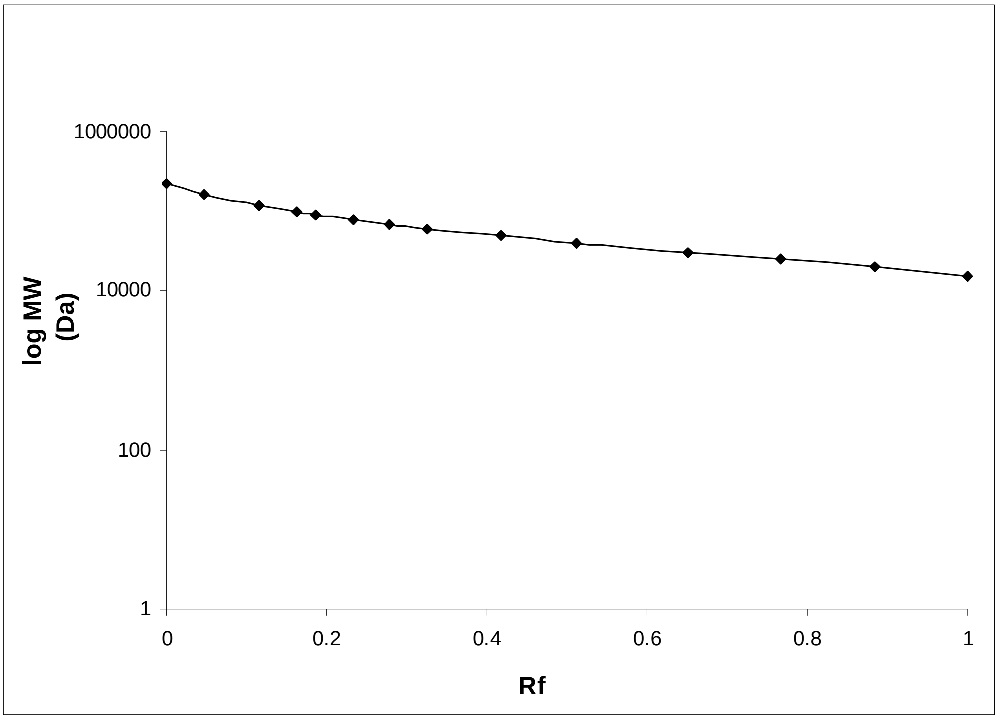
เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ภาพที่ 20 แสดงแถบโปรตีนในเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า เอนไซม์ดิบลินามาเรส เอนไซม์ที่ผ่านการแยก ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose โดยพบว่าแถบโปรตีนที่พบในสารละลายเอนไซม์ดิบจะมีแถบโปรตีนมากที่สุด แสดงว่ามีโปรตีนหลายชนิดอยู่ภายในนั้น และพบว่าโปรตีนที่ปนเปื้อนจะลดลงตามลำดับ เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และจะได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ดังนั้นเอนไซม์ลินามาเรสที่แยกได้ด้วยวิธีนี้จึงจัดเป็นเอนไซม์บริสุทธิ์

ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้โดยทำการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน SDS Molecular weight maker ชุด BenchMark™ Protein Ladder ของบริษัท Invitrogen ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ถึง 220,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 15 ชนิด โดยคำนวณหาค่า Rf ของเอนไซม์บริสุทธิ์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซมลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลังจะมีค่าประมาณ 70,000 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 20 แถบโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ลินามาเรสของน้ำยางมันสำปะหลัง ที่ผ่านขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ต่างๆ ที่ศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE 10 % gel และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue*R 250 เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (lane M), แถบโปรตีนของ Linamarase™ (lane 1), แถบโปรตีนของเอนไซม์ดิบจากน้ำยางมันสำปะหลัง (lane 2), แถบโปรตีนหลังตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (lane 3), แถบโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose (lane 4)

จากรายงานผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนต่างๆของมันสำปะหลังมี พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60,000 – 70,000 ดาลตัน โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากน้ำยางมันสำปะหลังจะมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ที่สุด คือ 70,000 ดาลตัน



ภาพที่ 21 น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS Molecular weight maker ชุด BenchMark™ Protein Ladder ของบริษัท Invitrogen สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ถึง 220,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 15 ชนิด

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรส

3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum temperature)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรส 4 ชนิด ดังนี้ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose เพื่อเปรียบเทียบกับสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

3.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ทางการค้า พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เมื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 20 องศาเซลเซียสจนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 22.ก) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว คือมีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือร้อยละ 31 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่แสดงกิจกรรมเลย ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรม เท่ากับร้อยละ 44, 52, 58, 72 และ 75 ของที่ optimum temperature คือ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ

จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์ดิบ พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เมื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 20 องศาเซลเซียสจนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 22.ข) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว คือแสดงกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือร้อยละ 56 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่แสดงกิจกรรมเลย ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 44, 50, 52, 70 และ 84 ของที่ optimum temperature คือ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.1.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 20 องศาเซลเซียสจนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อ กิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 22.ค) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว คือแสดงกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือร้อยละ 53 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่แสดงกิจกรรมเลย ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 44, 46, 56, 60 และ 85 ของที่ optimum temperature คือ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.1.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

เมื่อทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์ลินามาเรสคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 20 องศาเซลเซียสจนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อ กิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 22.ง) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว คือแสดงกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 58 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่แสดงกิจกรรมเลย ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรมเท่ากับ 44, 50, 52, 61 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ของที่ optimum temperature คือ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากการทดลองศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซมลินามาเรสทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบผลที่ได้แล้ว พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรม คือ 60 องศาเซลเซียส

3.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรส (stability temperature)

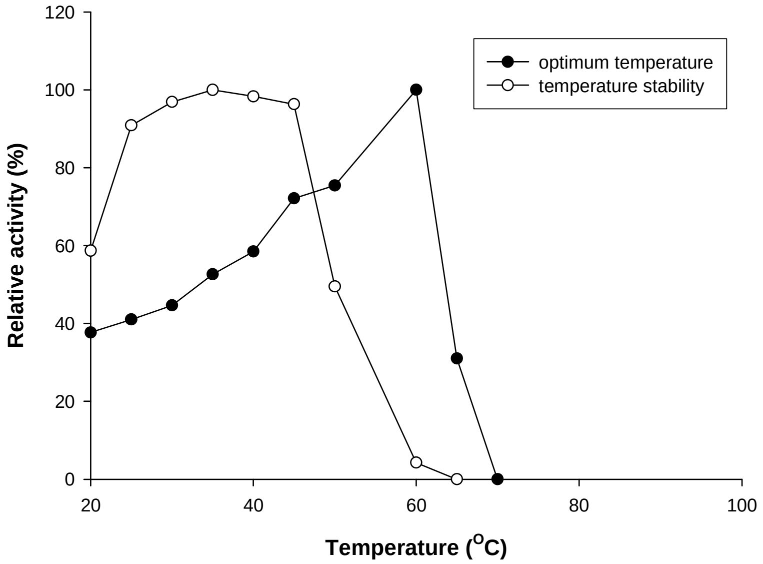
ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสที่ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่างๆ ดังนี้ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose เพื่อเปรียบเทียบกับสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

3.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

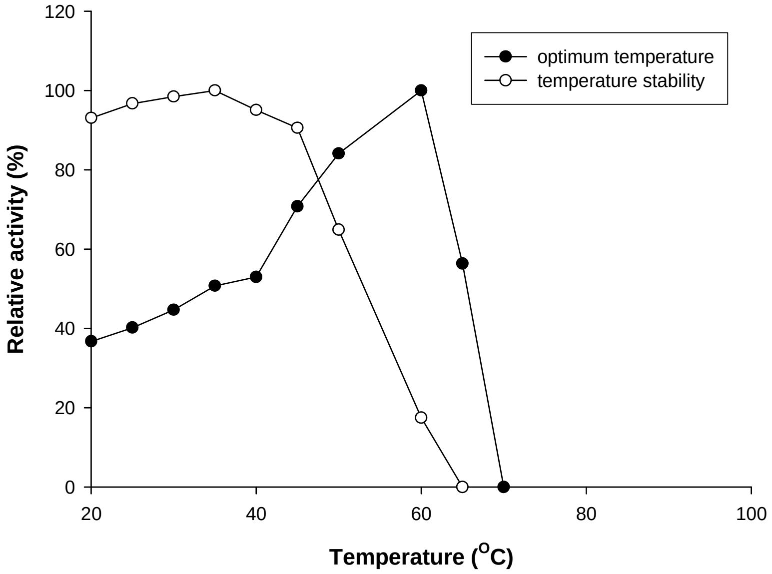
ในการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาได้ในช่วงร้อยละ 96 -100 โดยอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ความคงตัวของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 49 จนเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์มีความคงตัวลดลงมากขึ้น โดยเอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือเพียงร้อยละ 4 เมื่อนำเอนไซม์บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายหมด แสดงดังภาพที่ 22.ก

3.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ

จากผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสดิบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาได้ ในช่วงร้อยละ 91 -100 ซึ่งอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อให้เอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ความคงตัวของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 61 จนเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์มีความคงตัวลดลงมากขึ้น โดยเอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือเพียงร้อยละ 17 เมื่อนำเอนไซม์บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายหมด แสดงดังภาพที่ 22.ข

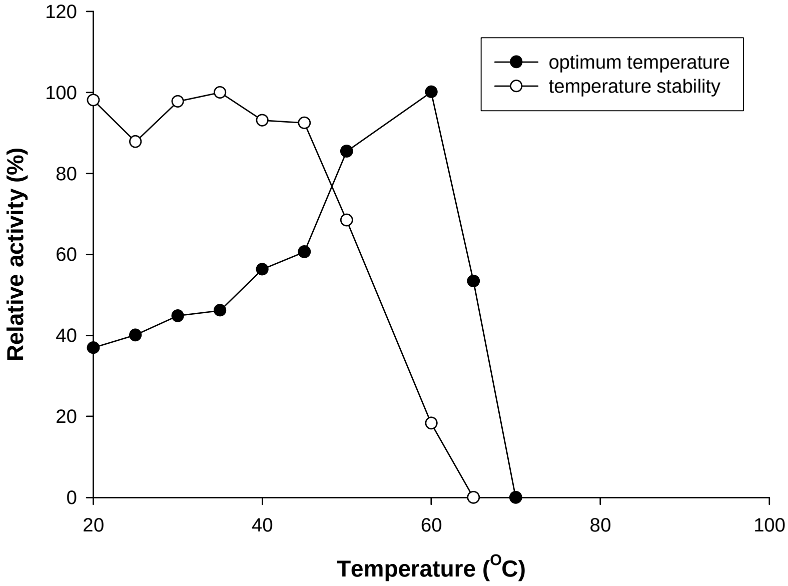


ก.) เอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

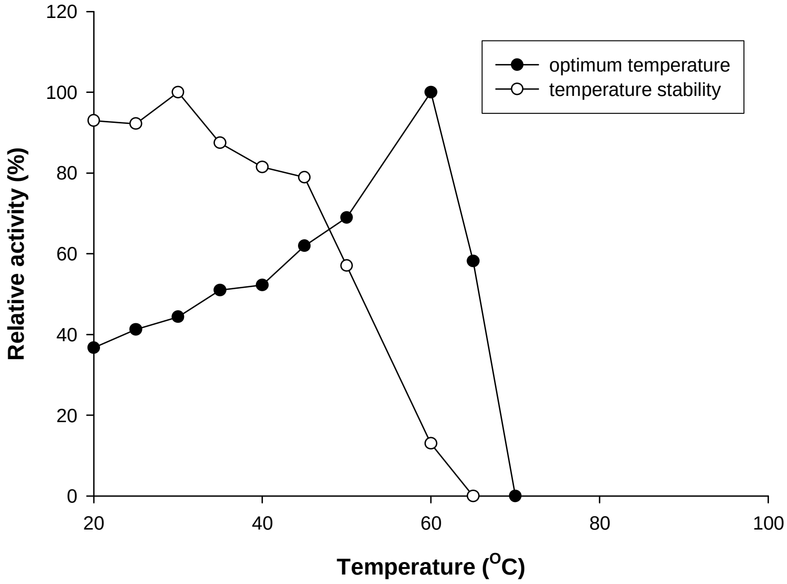


ข.) เอนไซม์ลินามาเรสดิบ (Crude enzyme)

ภาพที่ 22 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส ทั้ง 4 ชนิดและความคงตัวของเอนไซม์ (temperature stability) ที่อุณหภูมิต่างๆ



ค.) เอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ง.) เอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

ภาพที่ 22 (ต่อ) อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิดและความคงตัวของเอนไซม์ (temperature stability) ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.2.3 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาได้ ในช่วงร้อยละ 88 -100 ซึ่งอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ความคงตัวของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 68 จนเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์มีความคงตัวลดลงมากขึ้น โดยเอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือเพียงร้อยละ 18 เมื่อนำเอนไซม์บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายหมด แสดงดังภาพที่ 22.ค

3.2.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

จากผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาได้ ในช่วงร้อยละ 80 -100 ซึ่งอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ความคงตัวของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 57 จนเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์มีความคงตัวลดลงมากขึ้น โดยเอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือเพียงร้อยละ 13 เมื่อนำเอนไซม์บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายหมด แสดงดังภาพที่ 22.ง

จากการทดลองศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมและความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด ทำให้พิจารณากำหนดช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 30 - 35 องศาเซลเซียส ซึ่งถึงแม้จะไม่ใช่อุณหภูมิที่ทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดก็ตาม แต่ก็เป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวสูงและคงอยู่ได้สูงสุด

Yeoh (1988) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดได้จากส่วนของใบ, เปลือก และคอร์เท็กซ์จากหัวของมันสำปะหลัง และ Mkpong *et al.* (1990) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากใบมันสำปะหลัง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ 55 องศาเซลเซียส

Nok and Ikediobi (1990) สกัดเอนไซม์ลินามาเรส จากส่วนคอร์เท็กซ์ของหัวมันสำปะหลัง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ 30 องศาเซลเซียส

Elias *et al.* (1997) ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมและความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆของเอนไซมลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ได้จากน้ำยางของมันสำปะหลัง ที่ช่วงอุณหภูมิ 20 – 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ 35 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือร้อยละ 20 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเมื่อนำเอนไซม์ไปไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายหมด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ มีผลที่สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากส่วนของน้ำยางมันสำปะหลังเช่นเดียวกัน

3.3 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum pH)

ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างที่มีต่อเอนไซม์ลินามาเรส 4 ชนิด ดังนี้ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose เพื่อเปรียบเทียบกับสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

3.3.1 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ทางการค้า พบว่าค่าพีเอชที่ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมสูงสุดคือ พีเอช 7.0 เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 3.5 ถึง 6.5 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อพีเอชสูงขึ้น เป็น 7.5 และ 8.0 เอนไซม์จะยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก คือ มี % relative activity (เมื่อคิดเทียบกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0) เท่ากับร้อยละ 99 และ 98 ตามลำดับ (ภาพที่ 23.ก)

3.3.2 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ

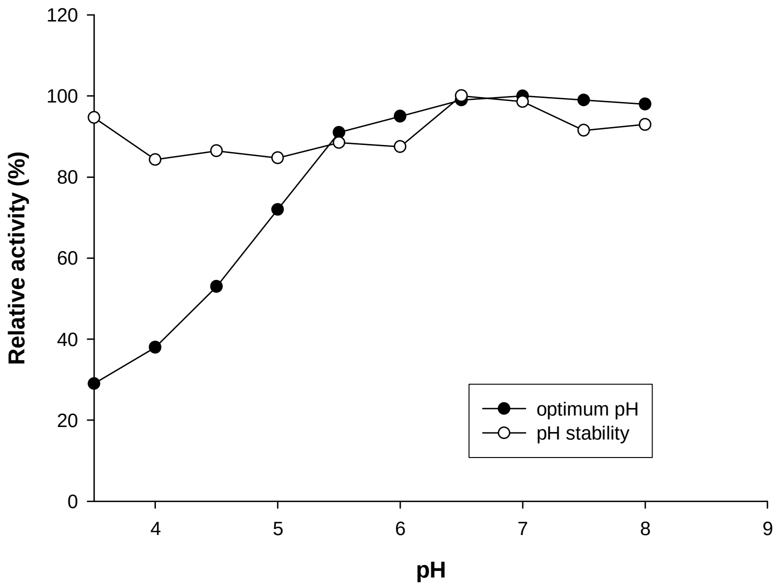
ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดิบ พบว่าพีเอชที่ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมสูงสุดคือ พีเอช 7.0 เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 3.5 ถึง 6.5 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 7.5 และ 8.0 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก คือ มี% relative activity (เมื่อคิดเทียบกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0) เท่ากับร้อยละ 97 และ 97 ตามลำดับ (ภาพที่ 23.ข)

3.3.3 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

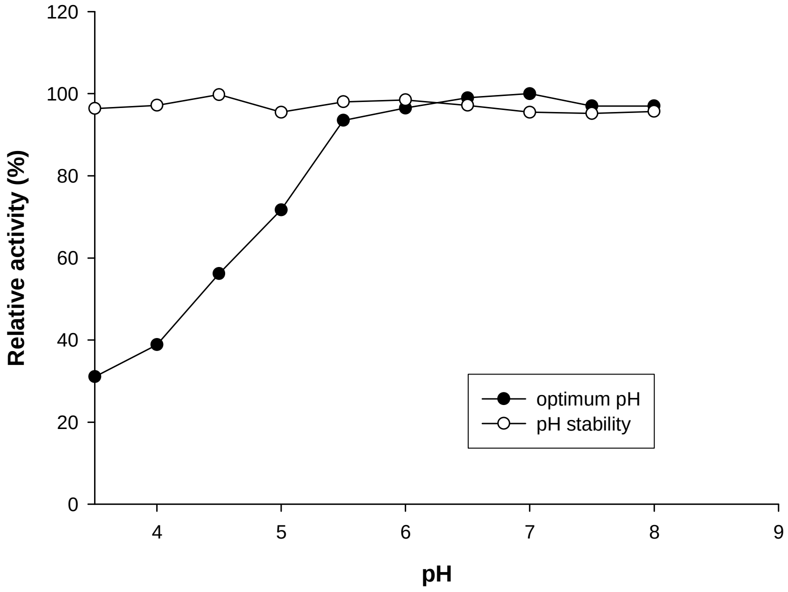
ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าพีเอชที่ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมสูงสุดคือ พีเอช 7.0 เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่ พีเอช 3.5 ถึง 6.5 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 7.5 และ 8.0 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก คือ มี% relative activity (เมื่อคิดเทียบกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0) เท่ากับร้อยละ 99 และ 97 ตามลำดับ (ภาพที่ 23.ค)

3.3.4 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose พบว่าพีเอชที่ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมสูงสุดคือ พีเอช 7.0 เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่ พีเอช 3.5 ถึง 6.5 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 7.5 และ 8.0 เอนไซม์จะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก คือ มี% relative activity (เมื่อคิดเทียบกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0) เท่ากับร้อยละ 99 และ 97 ตามลำดับ (ภาพที่ 23.ง)

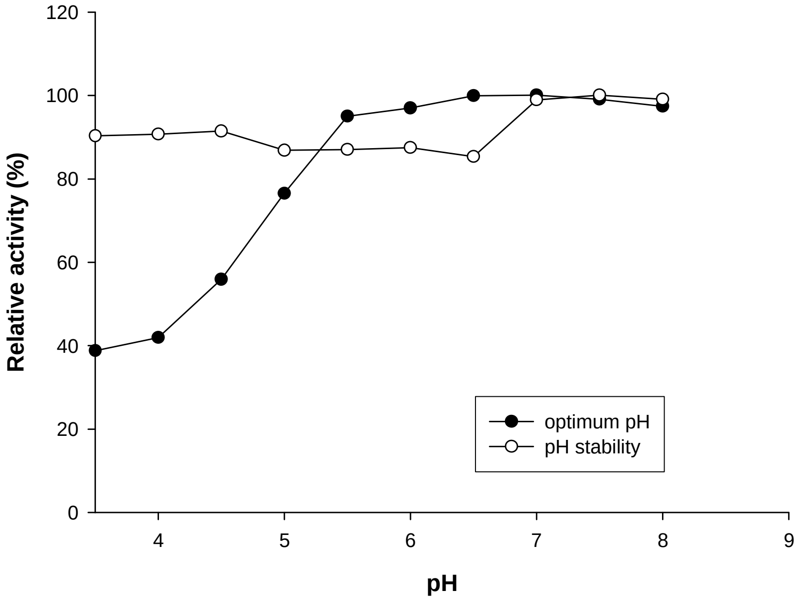


ก.) เอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

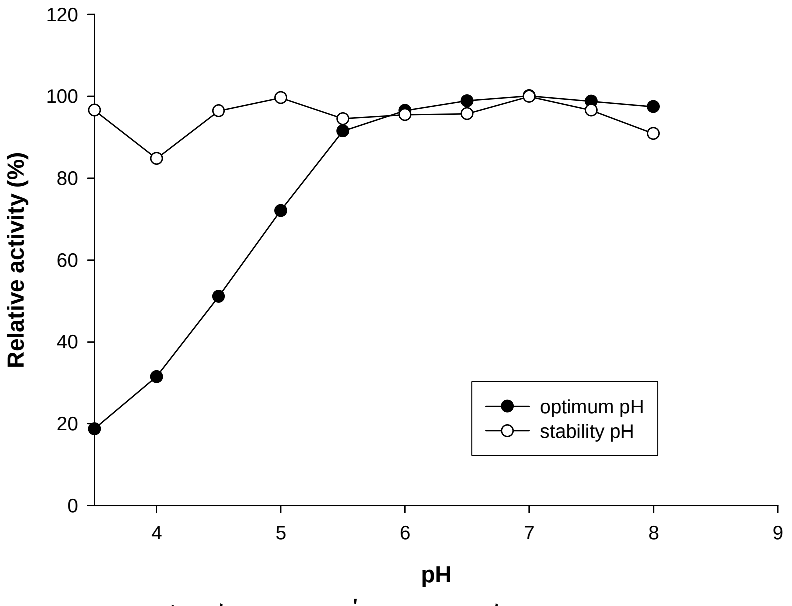


ข.) เอนไซม์ลินามาเรสดิบ (Crude enzyme)

ภาพที่ 23 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซมลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด (optimum pH) และความคงตัวของเอนไซม์ (pH stability) ที่พีเอชต่างๆ



ค.) เอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ง.) เอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

ภาพที่ 23 (ต่อ) ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด (optimum pH) และความคงตัวของเอนไซม์ (pH stability) ที่พีเอชต่างๆ

3.4 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรส (stability pH)

ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่มีต่อเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose เพื่อเปรียบเทียบกับสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

3.4.1 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้ามีความคงตัวดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดไปจนถึงเป็นด่างเป็นเวลา 30 นาที คือมีความคงตัวช่วงร้อยละ 84 - 100 เมื่อบ่มในสารละลายที่มีพีเอชต่างๆ ตั้งแต่ 3.5-8.0 (ภาพที่ 23.ก) ซึ่งพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 6.5 เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปอบ่มในสารละลายที่มีพีเอชที่มีความเป็นกรดสูงคือที่ พีเอช 3.5 เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรม ร้อยละ95 เมื่อคิดเทียบกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าเมื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีพีเอชตั้งแต่ 3.5-8.0 นั้น พบว่าเอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมอยู่ได้มากกว่าร้อยละ 84 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช กว้างทั้งที่เป็นกรดและเป็นด่าง

3.4.2 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ (crude enzyme)

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสดิบ มีความคงตัวดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดไปจนถึงเป็นด่างเช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า คือคงตัวช่วงร้อยละ 95-100 เมื่อบ่มในสารละลายที่มีพีเอชต่างๆ ตั้งแต่ 3.5 - 8.0 (ภาพที่ 23.ข) ซึ่งพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 6.0 เมื่อนำเอนไซม์ดิบไปอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชที่มีความเป็นกรดสูงคือที่พีเอช 3.5 ความคงตัวของเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 96 อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า เมื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีพีเอชตั้งแต่ 3.5-8.0 นั้น พบว่าเอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมอยู่ได้มากกว่าร้อยละ 95 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์ดิบมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ทางการค้า ในช่วงพีเอชกว้างทั้งที่เป็นกรดและเป็นด่าง

3.4.3 ผลของค่าความปืนกรดเป็นด่างต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต มีความคงตัวดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดไปจนถึงเป็นด่างเช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ดิบ เมื่อให้เอนไซม์อยู่ในพีเอชนั้นๆ เป็นเวลา 30 นาที คือคงตัวช่วงร้อยละ 85 - 100 เมื่อบ่มในสารละลายที่มีพีเอชต่างๆ ตั้งแต่ 3.5 - 8.0 (ภาพที่ 23.ค) ซึ่งพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 7.0 เมื่อนำเอนไซม์ไปอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชที่มีความเป็นกรดสูงคือที่พีเอช 3.5 ความคงตัวของเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ90 อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าเมื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีพีเอชตั้งแต่ 3.5-8.0 นั้น พบว่าเอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมอยู่ได้มากกว่าร้อยละ 85 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีความคงตัวใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้า ในช่วงพีเอชกว้างทั้งที่เป็นกรดและเป็นด่าง

3.4.4 ผลของค่าความปืนกรดเป็นด่างต่อความคงตัวของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose มีความคงตัวดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดไปจนถึงเป็นด่างเช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ดิบ เมื่อให้เอนไซม์อยู่ในพีเอชนั้นๆ เป็นเวลา 30 นาที คือคงตัวช่วงร้อยละ 85 - 100 เมื่อบ่มในสารละลายที่มีพีเอชต่างๆ ตั้งแต่ 3.5 - 8.0 (ภาพที่ 23.ง) ซึ่งพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 7.0 เมื่อนำเอนไซม์ไปอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชที่มีความเป็น กรดสูงคือที่พีเอช 3.5 ความคงตัวของเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 97 จะเห็นได้ว่าเมื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีพีเอชตั้งแต่ 3.5-8.0 นั้น พบว่าเอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมอยู่ได้มากกว่าร้อยละ 85 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose มีความคงตัวใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้า ในช่วงพีเอชกว้างทั้งที่เป็นกรดและเป็นด่าง

จากการศึกษาของ Cooke *et al.* (1977), Eksittikul and Chulavatnatol (1988), Yeoh (1988), Nok and Ikediobi (1990) และ Elias *et al.* (1997) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดอยู่ในช่วงพพีเอช 6.0 – 6.4

Yeoh (1988) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดได้จากส่วนของใบ เปลือก และคอร์เท็กซ์จากหัวของมันสำปะหลัง พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ พีเอช 6.0 – 7.3

Mkpong *et al.* (1990) แยกเอนไซม์ลินามาเรสจากใบมันสำปะหลัง พบว่า พีเอชที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ พีเอช 7.0

จากการทดลองศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมและความคงตัวที่พีเอชต่างๆของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าทำให้พิจารณากำหนดช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ คือ พีเอช 7.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และเป็นพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวสูงและคงอยู่ได้สูงสุด

4. การนำเอนไซม์ลินามาเรสไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

ในการวิเคระห์สารประกอบไวยาไนด์จะนำเอนไซม์ลินามาเรส คือ เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose และเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™) มาศึกษาผลของการทำปฏิกิริยาสลายพันธะบีต้า-กลูโคซิดิก ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ในระดับที่แตกต่างกัน แยกเป็นกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้คือ กลุ่มแป้งมันสำปะหลัง กลุ่มฟลาวมันสำปะหลัง กลุ่มมันสำปะหลังต้ม และกลุ่มมันสำปะหลังสด เปรียบเทียบปริมาณไซยาไนด์ที่วิเคราะห์ได้ทางสถิติ โดยกำหนดความเข้มข้นในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ณ ที่ความเข้มข้น 5 หน่วย (unit) ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ของ O’ Brien *et al.* (1991)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในกลุ่มตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง (ตารางที่ 9) พบว่าการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลที่ได้มีลักษณะเดียวกันกับกลุ่มตัวอย่างฟลาวมันสำปะหลังและเนื้อมันสด ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และ 12 ตามลำดับ

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในกลุ่มตัวอย่างมันต้ม (ตารางที่ 11) พบว่าเอนไซม์ที่ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้ไม่แตกต่างหรือเทียบเท่ากันกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า คือ เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose ส่วนเอนไซม์ดิบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ไม่แตกต่างกันเอง แต่ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ได้นั้นแตกต่างจากผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ได้จากเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยผลที่วิเคราะห์ได้จากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนั้นมีปริมาณที่ต่ำกว่าผลจากการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ได้จากเอนไซม์ลินามาเรส ทางการค้า

ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในกลุ่มเปลือกสดของมันสำปะหลังนั้น พบว่าเอนไซม์ที่ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า คือเอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose ดังผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 13 โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ

DEAE-cellulose นั้นจะมีผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า มากกว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ได้จากเอนไซม์ดิบ และเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาจากกลุ่มตัวอย่างชุดที่ 3 ในกลุ่มของตัวอย่างเปลือกมันสด จะเห็นได้ชัดเจนขึ้นว่าเอนไซม์ดิบ และเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นจะให้ผลที่แตกต่างจากเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose นั้นให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) จึงสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้ามากที่สุดและเหมาะสมที่สุด คือ เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose

ตารางที่ 9 ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด

แป้งมันสำปะหลัง	ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ (มิลลิกรัม HCN ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอนไซม์ลินามาเรส			
	Linamarase™	Crude	Precipitated by $(NH_4)_2SO_4$	Purified by DEAE-cellulose
1	0.82 ± 0.04 a	0.80 ± 0.05 a	0.08 ± 0.03 a	0.81 ± 0.01 a
2	0.19 ± 0.03 a	0.20 ± 0.00 a	0.23 ± 0.00 a	0.19 ± 0.01 a
3	0.18 ± 0.03 a	0.17 ± 0.00 a	0.18 ± 0.02 a	0.17 ± 0.03 a
4	0.18 ± 0.04 a	0.16 ± 0.01 a	0.16 ± 0.01 a	0.18 ± 0.02 a
5	0.44 ± 0.03 a	0.44 ± 0.02 a	0.45 ± 0.01 a	0.44 ± 0.03 a
เฉลี่ย	0.363 ns	0.354 ns	0.364 ns	0.357 ns

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ns คือ not significant

ตารางที่ 10 ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างฟลาวมันสำปะหลังที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด

ฟลาวมันสำปะหลัง	ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ (มิลลิกรัม HCN ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอนไซม์ลินามาเรส			
	Linamarase™	Crude	Precipitated by $(NH_4)_2SO_4$	Purified by DEAE-cellulose
1	2.06 ± 0.06 a	2.06 ± 0.00 a	2.06 ± 0.03 a	2.01 ± 0.06 a
2	1.69 ± 0.03 a	1.68 ± 0.08 a	1.72 ± 0.09 a	1.75 ± 0.07 a
3	1.72 ± 0.05 a	1.78 ± 0.03 a	1.72 ± 0.05 a	1.71 ± 0.05 a
4	1.24 ± 0.03 a	1.20 ± 0.00 a	1.37 ± 0.07 a	1.31 ± 0.07 a
5	2.99 ± 0.03 a	2.99 ± 0.03 a	2.98 ± 0.07 a	2.95 ± 0.03 a
เฉลี่ย	1.94 ns	1.93 ns	1.97 ns	1.95 ns

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ns คือ not significant

ตารางที่ 11 ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังต้มที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด

มันสำปะหลังต้ม	ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ (มิลลิกรัม HCN ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอนไซม์ลินามาเรส			
	Linamarase™	Crude	Precipitated by $(NH_4)_2SO_4$	Purified by DEAE-cellulose
1	21.53 ± 0.33 a	21.63 ± 0.51 a	20.66 ± 0.13 a	21.66 ± 0.29 a
2	27.95 ± 0.36 a	27.49 ± 0.61 a	27.80 ± 0.67 a	28.05 ± 0.31 a
3	36.78 ± 0.22 a	35.57 ± 0.45 b	34.98 ± 0.27 b	36.94 ± 0.22 a
4	42.85 ± 0.13 a	42.57 ± 0.47 a	42.33 ± 0.25 a	42.50 ± 0.34 a
5	66.44 ± 0.38 a	64.13 ± 0.80 b	64.32 ± 0.53 b	66.16 ± 0.69 a
เฉลี่ย	39.11 a	38.28 b	38.02 b	39.06 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ns คือ not significant

ตารางที่ 12 ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังส่วนเนื้อสดที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด

มันสำปะหลังส่วนเนื้อ	ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ (มิลลิกรัม HCN ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอนไซม์ลินามาเรส			
	Linamarase™	Crude	Precipitated by $(NH_4)_2SO_4$	Purified by DEAE-cellulose
1	1134.00 ± 23.30 a	1127.33 ± 4.06 a	1145.26 ± 12.86 a	1144.18 ± 44.29 a
2	995.50 ± 6.89 a	988.85 ± 12.25 a	991.65 ± 1.14 a	1022.42 ± 6.95 a
3	511.76 ± 1.45 a	513.64 ± 5.08 a	511.76 ± 4.11 a	505.16 ± 4.52 a
4	951.97 ± 8.97 a	961.45 ± 28.56 a	945.65 ± 50.33 a	971.32 ± 2.88 a
5	604.08 ± 2.97 a	614.66 ± 15.47 a	620.54 ± 11.19 a	609.57 ± 2.97 a
เฉลี่ย	839.56 ns	841.19 ns	842.97 ns	850.53 ns

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ns คือ not significant

ตารางที่ 13 ปริมาณไซยาไนด์ในตัวอย่างมันสำปะหลังส่วนเปลือกสดที่วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (ความเข้มข้น 5 Unit) 4 ชนิด

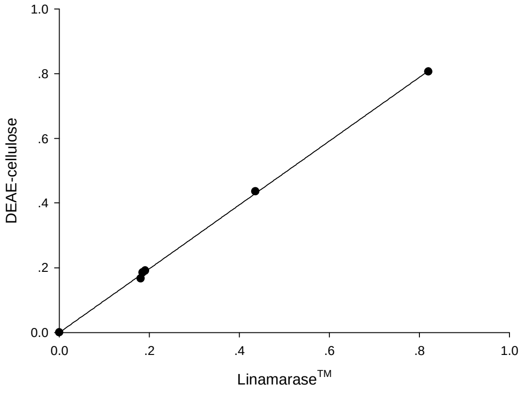
มันสำปะหลังส่วนเปลือก	ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ (มิลลิกรัม HCN ต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอนไซม์ลินามาเรส			
	Linamarase™	Crude	Precipitated by $(NH_4)_2SO_4$	Purified by DEAE-cellulose
1	1157.45 ± 51.55 a	1163.19 ± 43.28 a	1171.79 ± 24.84 a	1163.19 ± 2.87 a
2	1468.60 ± 24.28 a	1476.99 ± 20.30 a	1463.70 ± 26.18 a	1459.50 ± 8.35 a
3	558.91 ± 2.41 b	593.49 ± 2.90 a	582.80 ± 7.78 a	567.71 ± 2.41 b
4	1235.07 ± 90.56 a	1361.42 ± 52.79 a	1354.32 ± 46.59 a	1205.06 ± 54.86 a
5	543.32 ± 3.00 a	547.24 ± 19.92 a	531.56 ± 10.40 a	556.65 ± 1.81 a
เฉลี่ย	992.67 a,b	1028.46 a	1020.83 a,b	990.42 b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

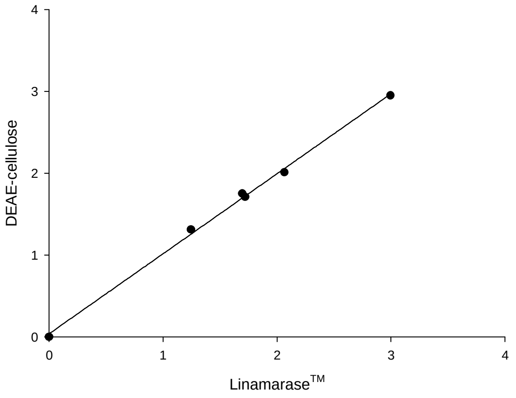
ns คือ not significant

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติในกลุ่มตัวอย่างชนิดต่างๆสามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้ามากที่สุดและเหมาะสมที่สุด ในทุกๆกลุ่มชนิดตัวอย่างที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่แตกต่างกัน คือ เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose จากผลดังกล่าวสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟแบบ DEAE-cellulose ผลที่ได้พบว่าความสัมพันธ์ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ในกลุ่มตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง กลุ่มฟลาวมันสำปะหลัง กลุ่มมันสำปะหลังต้ม กลุ่มหัวมันสำปะหลังสด และกลุ่มเปลือกมันสำปะหลังสด คือ 0.9867, 0.9779, 0.9945, 1.0203 และ 0.9935 ตามลำดับ ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าความชันของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไวยาไนด์ในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง เมื่อคิดเทียบกับ 1 จะมีค่าเท่ากับ 0.0681 ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ที่วิเคราะห์ได้ของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้ากับเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและเอนไซม์ดิบ (ตารางที่ 14) จะมีค่าความแตกต่างของค่าความชันเมื่อเทียบกับ 1 เท่ากับ 0.0998 และ 0.0878 ตามลำดับ จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในกลุ่มผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังและตัวอย่างมันสำปะหลัง คือ เอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

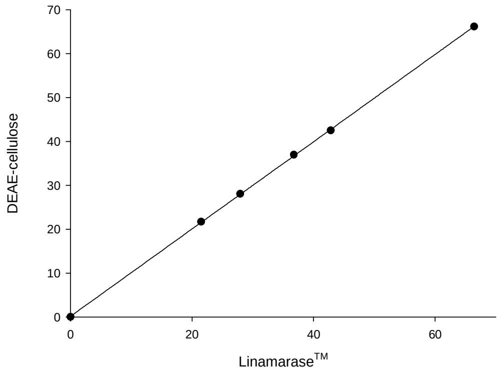
จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์อาจนำเอนไซม์ดิบหรือเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายในการเตรียมมีราคาไม่สูง แต่ถ้าพิจารณาอย่างละเอียดตามผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วนั้น จะพบว่ามีบางผลิตภัณฑ์ของมันสำปะหลังที่ไม่สามารถนำเอนไซม์ทั้ง 2 ไปใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ได้ เช่น ในกลุ่มผลิตภัณฑ์มันต้ม ซึ่งอาจเกิดจากการรบกวนของสารปรุงแต่งในผลิตภัณฑ์ได้ โดยสารเคมีอื่นๆที่ใช้อาจมีผลต่อโปรตีนตัวอื่นๆที่มีอยู่ในเอนไซม์ดิบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ไม่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ในกลุ่มตัวอย่างเปลือกสดซึ่งเป็นส่วนที่มีการปะปนของสารประกอบฟีนอล และอื่นๆ ที่ทำให้ผลของการวิเคราะห์ที่ได้ของเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดให้ผลแตกต่างจากเอนไซม์บริสุทธิ์นั้นเอง



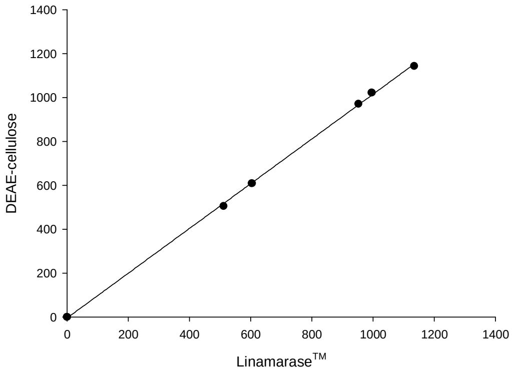
ก.) กลุ่มตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง



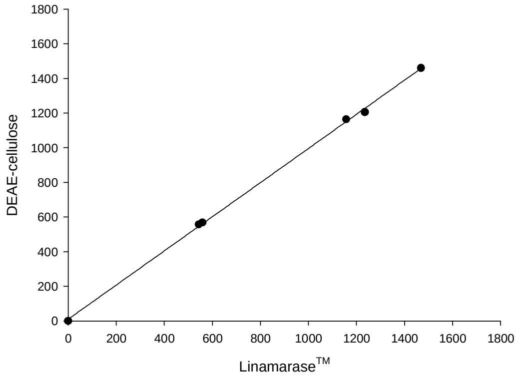
ข.) กลุ่มตัวอย่างฟลาวมันสำปะหลัง



ค.) กลุ่มตัวอย่างมันต้ม



ง.) กลุ่มตัวอย่างเนื้อมันสำปะหลังสด



จ.) กลุ่มตัวอย่างเปลือกมันสำปะหลังสด

ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไซยาไนด์ที่วิเคราะห์โดยเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟแบบ DEAE-cellulose ในกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังต่างๆ

ตารางที่ 14 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าและเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ

กลุ่มตัวอย่างมันสำปะหลัง	เอนไซม์ลินามาเรส					
	เอนไซม์ดิบ		เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือ		เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose	
	ค่าความชัน	ผลต่างความชัน	ค่าความชัน	ผลต่างความชัน	ค่าความชัน	ผลต่าง* ความชัน
1. แป้ง	0.9843	0.0157	0.9751	0.0249	0.9867	0.0133
2. ฟลาว	1.0013	0.0013	0.9866	0.0134	0.9779	0.0221
3. มันต้ม	0.9656	0.0344	0.9698	0.0302	0.9941	0.0059
4. เนื้อ	0.9954	0.0046	1.0004	0.0004	1.0203	0.0203
5. เปลือก	1.0318	0.0318	1.0309	0.0309	0.9935	0.0065
ผลรวมความต่าง		0.0878		0.0998		0.0681

ผลต่างความชัน = 1 – ความชัน

ทั้งนี้ * ในกรณีที่เอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า และเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์เหมือนกัน กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณไซยาไนด์ของเอนไซม์ทั้ง 2 ควรมีค่าเท่ากับ 1

สรุป

ในการเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสจากน้ำยางมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ดิบที่มีค่า specific activity เท่ากับ 21.28 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นเกลือเท่ากับร้อยละ 60 จะให้เอนไซม์ที่มีค่า specific activity เพิ่มขึ้นเป็น 25.71 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มี % recovery เท่ากับร้อยละ 52 และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.21 เท่า

ในขณะที่การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose จะได้เอนไซม์ที่มีค่า specific activity เพิ่มขึ้นเป็น 63.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มี % recovery เท่ากับร้อยละ 21 และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2.98 เท่า เมื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ทางการค้า เอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์คือเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน

นอกจากนี้เอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด คือเอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose และเอนไซม์ทางการค้า เกิดกิจกรรมดีในช่วงอุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำเนินกิจกรรม (optimum temperature) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีความคงตัว (temperature stability) ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมอย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ในการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ 7.0 และมีความคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้างคือ 3.5 – 8.0 โดยที่พีเอช 8.0 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมเอนไซม์เฉลี่ยที่ร้อยละ 85

ในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้กับงานตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์จากกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่มีระดับสารประกอบไซยาไนด์ที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ด้วยเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 3 ชนิด คือเอนไซม์ดิบ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์

โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า พบว่าจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose นั้นมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ได้เทียบเท่ากับเอนไซม์ทางการค้าในทุก ๆ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2526. **มันสำปะหลัง**. เอกสารวิชาการเล่มที่ 7. กรุงเทพฯ.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์ ม.เกษตร, กรุงเทพฯ.

วิไล สันติโสภาศรี, กาญจนา กู้โรจนวงศ์ และกล้าณรงค์ ศรีรอต. 2541. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีในหัวมันสำปะหลังเปรียบเทียบพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว. *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, 3-5 กุมภาพันธ์ 2541**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2546**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

_______. 2547. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2547**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

_______. 2550. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2550**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

Arguedas, P. and R.D. Cooke. 1982. Residual cyanide concentrations during the extraction of cassava starch. **J. Food Technol**. 17: 251-262.

Blanco, B.S. and Gorniak, S.L. 2003. Milk transfer of cyanide and thiocyanate: cyanide exposure by lactation in goats. **Vet. Res**. 34: 213-220.

Boxer, G.E. and Rickards, J.C. 1952. Determination of thiocyanate in body fluids. **Arch. Biochem. Biophys**. 39: 292-300.

Bradbury, J.H., Egan, S.V. and Lynch, M.J. 1991. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. **J. of the Sci. of Food and Agri**. 55: 277-290.

Bradbury, J.H., M.G. Bradbury and S.V. Egan. 1991. Compearison methords of analysis of cyanogens in cassava. ***In*** **International Workshop on cassava safety**. 87 – 96. The Netherlands.

Brimer, L. and L. Dalgaard. 1984. Cyanogenic glycosides and cyanohydrins in plant tissues,qualitive and quantitive determination by enzymatic post column cleavage and electrochemical detection, after separation by high performance liquid chromatography. **J. Chrom**. 303: 77.

Brimer, L., M.J.R. Nout and G. Tuncel. 1998. β-glycosidase (amygdalase and linamarase) from *Endomyces fibuliger* (LU 677) : formation and crude enzyme properties. **Appl Microbiol Biotechnol**. 49: 182-188.

Bunmasiri, A. 2004. **Purification and Characterization of Endoglucanase from *Pseudeurotium* sp. HTN 14/1**. M.Sc. Thesis in Biochemistry, Kasetsart University.

Butler , G.W., R.W. Bailey and L.D. Kennedy. 1965. Studies on the glucosidase “Linamarase”. **Phytochem**. 4 : 369 – 381.

Christensen, H.E. 1976. Registry of toxic effects of chemical substances. **National Institute of Occupational Safety and Health. DHEW Publication** .

Chueskul, S. 1995. **Cassava α-hydroxytrile lyase**. M.Sc. Thesis in Biochemistry, Faculty of graduate studies, Mahidol University.

Cooke, R.D., G.G. Blake and J.M. Battershill. 1978. Purification of cassava linamarase. **Phytochem.** 17: 381 – 383.

Cordex Alimentarius Commission. 1989. **Cordex regional standard : Part C.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

Eksittikul, T. and M. Chulavatanatol. 1988. Characterization of cyanogenic - β - glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Arch Biochem Biophys**. 266 (1): 263 – 269.

Elias, M., B. Nambisan and P.R. Sudhakaran. 1997. Characterization of linamarase of latex and its localization in petioles in cassava. **Arch Biochem Biophys**. 341 (2): 222 – 228.

Essers, A.J.A., M. Bosveld., R.M. van der Grift, and A.G.J. Voragen. 1993. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen**. J. of the Sci. of Food and Agri**. 63: 287-296.

Fan, T.M.W. and E.E. Conn. 1985. Isolation and characterization of two cyanogenic-β- glucosidase from flax seeds. **Arch Biochem Biophys**. 243 (2): 361-373.

Franzl, S., I. Achermann and A . Nahrtedt. 1989. Purification and charactrization of a -β- Glucosidase (linamarase) from the hemolymph of *Zygaena trifolii* Esper, 1783 (Insecta, Lepidoptera). **Experientia (BESEL).** 45 (8): 712-719.

Goldstein, F. and F. Rieders. 1953. Conversion of thiocyanate to cyanide by erythrocytic enzyme. **Am. J. Physiol**. 173: 287.

Go'mez, G., M. Valdivieso, L.E. Zapata and C. Pardo. 1984. Techical note: Cyanide elimination, chemical composition and evaluation in breadmarking of oven dried cassava peeled root chips or slices. *In* **J. of Food Tech**. 19: 493 – 498.

Haque, M.R. and J.H. Bradbury. 1999a. Preparation of linamarase solution from cassava latex for use in the cassava cyanide kit. **Food Chem**. 67: 305-309.

_______ and _______. 1999b. Simple method for determination of thiocyanate in urine. **Clin. Chem**. 45: 1459-1464.

Hosel, W. and E.E. Conn. 1982. The glycone specifity of plant β-glycosidases. **TIBS.** 7: 219-221.

Hughes, M.A. and M.A. Dunn. 1982. Biochemical characterization of the Li locus which controls the activity of the cyanogenesic -β-Glucosidase (E.C.3.2.1.2.1) in *Trifolium repens.* **Plant Mol Biol**. 1: 169-182.

Hughes, M.A., J. Hughes, S. Liddle and Z. Keresztessy. 1994. Biochemistry and molecular biology of cyanogenesis. ***In*** **CIAT. The cassava biotechnology Network. Vol II Proceeding of the second international scientific meeting, Bogor, Indonesia, 22 – 26 August 1994**. 385 – 395.

Ikediobi, C.O., E.C. Ogundu ans A.I. Ukoha. 1985. Production of linamarase by *Aspergillus sydowi* and *Fusarium equiseti*. **Process Biochem**. 22: 99-102.

Ikediobi, C.O., S. Ibrahim and A.I. Ogabonna. 1987. Linamarase from *Fusarium equiseti*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 25: 327-333.

Jones, D.A. 1998. Why are so many food plants cyanogenic?. **Phytochem**. 47 (2): 155-162.

Kisamanonta, P. 1989. **Some Structural Characteristics of Linamarase from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** M.Sc. Thesis in Biochemistry, Faculty of graduate studies, Mahidol University.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of Bacteriophage T_4. **Nature**. 227: 680-685.

Lang, S. 1933. Die Rhodanbildnny in Tierkorper**. Biochem. Z**. 259: 243.

Lundquist, P., J. Martensson, B. Sorbo and S. Ohman. 1979. Method for determining thiocyanate in serum and urine. **Clin. Chem**. 25: 678-681.

McMahon, J.M., W.L.B. White and R.T. Sayre. 1995. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **J. of Experimental Botany**. 46: 731-741.

Meister, A. 1953. Preparetion and enzymatic reactions of the Ketoanalozines of asparagines and glutamine. **Fed. Proc**. 12: 245.

Montreuil, J., S.H. Bouquelet, J. Debray, J.C. Lemoine, G. Spik Michalski and G. Strecker. 1994. Chapter 5 Glycoprotien. p248. ***In* M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (eds).** Carbohydrate analysis. 2nd. IRL press, New York.

Mpkong, O.E., H. Yan, G. Chism and R.T. Sayre. 1990. Purification, characterization and localization of linamarase in cassava. **Plant Physiology**. 93: 176-181.

Nambisan, B. 1999. Cassava latex as a source of linamarase for determination of linamarin**. J. of Agri. And Food Chem**. 47: 372-373.

Nashida, I.T., M. Hiraiwa and Y. Uda. 1987. Purification and properties of β-D-glucosidase (linamarase) from the butter bean, *Phaseolus lunatus.* **J. Biochem.** 101: 847-854.

O'Brien G.M., A.J. Taylor and N.H. Poulter. 1991. Improved enzymic assay for cyanogens in fresh processed cassava. **J. Sci. Food Agric**. 56: 277-289.

Okafor, N. and M.A.N. Ejiofor. 1985. The linamarase of *Leuconostoc mesenteroides*: Production, isolation and some properties. **J. Sci Food Agri**. 56: 277-289.

Padmaja, G. 1995. Cyanide detoxicfication in cassava for food and feed uses. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 35 (4): 299-339.

Phamacia Fine Chemicals. 1991. **Ion Exchange Chromatography; Principles and methods**. Phamacia Fine Chemicals AB. Sweden.

Phongsak, Th. 2001. **Transglycosylation of Alcohols by Cassava Linamarase.** M.Sc. Thesis. Mahidol Univesity. Bangkok. Thailand.

Posci, I., L. Kiss, M.A. Hughes and P. Nanasi. 1989. Kinetic investigation of the substrate specifity of the cyanogenic β-D-glucosidase(linamarase) of white clover. **Arch Biochem Biophys**. 272: 496-506.

Poulton, J.E. 1990. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiol**. 94: 401-405.

Prawat, H., C. Mahidol, S. Ruchirawat, U. Prawat, P. Tuntiwachwutikul, U. Tooptakong, W.C. Taylor, C. Pakawatchai, B.W. Skelton and A.H. White. 1995. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. **Phtochem**. 40 (4): 1167-1173.

Rosling, H. 1996. Molecular anthropology of cassava cyanogesis. pp 315-327***. In* B.W.S. Sorbal(eds.)**. The impact of plant molecular genetics. Birkhauser. Boston.

Selmar, D., F.J.P.C. Carvalho and E.E. Conn. 1987. A colorimetric assay for α-Hydroxynitrile lyase. **Anal Biochem.** 166: 208 – 211.

Selmar, D. 1994. Translocation of cyanogenic glucoside in cassava. ***In*: Acta Horticultureae No. 375,** International Workshop on Cassava Safty, held in Ibagan, Nigeria, March 1 – 4, 1994. Eds. M. Bokanga, A. J. A. Essers, N. Poulter, H. Rosling and O. Tewe. P.J. Jansen b.v., Leiden, The Netherlands.

Sriroth, K., K. Piyachomkwan, S. Wanlapatit and C.G. Oates. 2000. Cassavastarch technology: the Thai experience. **Starch**. 52: 439 – 449.

Tapper, B.A. and P.F. Reay. 1973. Cyanogenic glycosides and glycosinolates. pp 447-476***. In* C.W. Butter and R.W. bailey (eds.).** Chemistry and biochemistry of herbage, 1. Academic press. London.

Toyobo enzymes. 1996. **Toyobo Enzymes**. Toyobo Biochemical Operations Department, 143-146.

Vennesland, B., P.A. Castric, E.E. Conn, L.P. Solomonson, M. Volini and J. Westly. 1982. Cyanide metabolism summary of minisymposium presented at the 72nd annual meeting of the American society of biological chemists. **Fre Proc**. 42: 2639-2648.

Vetter, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**. 38: 11-36.

Vesey, C. J., H. McAllister and R. M. Langford. 1999. A safer method for the measurement of plasma thiocyanate. **J. Anal. Toxico**. 23:134-135.

Wood, T.M. 1966. The isolation, properties and enzymatic translocation of linamarin from cassava. **J. of Sci. of Food and Agri**. 17: 85-90.

Yeoh, H.H. 1989. Kinetic properties of β- glucosidase from cassava**. Phytochem**. 28 (3) : 721 – 724.

Yeoh, H.H. 1992. Cassava β- glucosidase electrode prepared with photocrosslinkable prepolymer resins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 15: 221-225.

Yeoh, H.H., J.H. Bradbury and S.V. Egan. 1997. A simple and rapid method for isolating cassava leaf linamarase suitable for cassava cyanide determination. **J. of Sci. of Food and Agri**. 75: 258-262.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รายละเอียดวิธีการทดลอง

1. การเตรียมบัฟเฟอร์

1.1 การเตรียม Acetate buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

Stock solutions

สารละลาย A : 0.2 M acetic acid (CH_3COOH 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M sodium acetate (CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ$CH_3COONa.3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.4	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

1.2 การเตรียม Phosphate buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

Stock solutions

สารละลาย A : 0.2 M monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic potassium phosphate ($K_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.6	22.05	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

2. การเตรียมคอลัมน์โครมาโตกราฟ DEAE-cellulose

นำ DEAE-Cellulose จากบริษัท Sigma ทำการ regenerate โดยการนำอนุภาค DEAE-cellulose แช่ในน้ำกลั่น (deionized water, DI) นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายส่วนบนออก เพื่อเอาส่วนที่เป็นผงแขวนลอยออกไป หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบนออกอีก ทำซ้ำเช่นนี้ 5-6 ครั้ง แล้วกรองผ่าน suction pump หลังจากนั้นแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออกโดยการกรองผ่าน suction pump แล้วทำซ้ำเช่นเดิมอีกครั้ง นำอนุภาคมาแช่ต่อในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ที่ทำการ regenerate เป็นเวลานานไม่เกิน 10 นาที กรองโดยใช้ suction pump แช่อนุภาคต่อในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.1 M ใน NaCl 0.5 M เป็นเวลาประมาณ 10 นาที กรองผ่าน suction pump นำมาแช่ในน้ำกลั่น (deionized water, DI)และล้างออกด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ suction pump จนกระทั่งน้ำที่กรองผ่านอนุภาคออกมามีพีเอชเป็น 5.0 นำอนุภาคที่ผ่านการ regenerate แล้วแช่ใน NaCl ความเข้มข้น 1 M ปรับพีเอชด้วย NaOH จนกระทั่งได้พีเอชเป็น 7-8 แล้วกรองอนุภาค ผ่านน้ำกลั่น DI ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วละลายอนุภาคใน phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วกรองออก หลังจากนั้นนำอนุภาคกลับไปแช่ใน phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองออก แล้วละลายอนุภาคกลับไปใน phosphate buffer 0.01 M พีเอช 6.0 ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ นำอนุภาคแขวนลอยที่ได้ไปทำการไล่ฟองอากาศออกก่อนบรรจุคอลัมน์ โดยการบรรจุคอลัมน์ช่วงแรกให้ใช้แรงดึงดูดโลกช่วยในการเรียงตัว แล้วจึงค่อยใช้ pump ที่ความเร็วตามที่กำหนดในการ run ตัวอย่างช่วยในการเรียงตัวให้แน่นในตอนท้าย

3. การเตรียม electrophoresis ชนิด sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 Acrylamide stock solution

ใช้สำหรับเตรียม ruuning gel และ stacking gel ประกอบด้วย

Acrylamide	14.6	กรัม
Bis	0.4	กรัม

ละลาย acrylamide และ Bis ในน้ำdeionized 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชา

3.1.2 1.5 M Tris-Hcl , พีเอช 8.8, 6.8

Tris base	18.15	กรัม
Deionized water	60	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 6 N HCl ดังนี้

พีเอช 8.8 สำหรับเจล 10 % T และ พีเอช 6.8 สำหรับเจล 4 % T เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 0.5 M Tris-HCl , พีเอช 6.8

Tris base	6	กรัม
Deionized water	60	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 6 N HCl ที่พีเอช 6.8

3.1.4 10 % (w/v) SDS

SDS	10	กรัม
Deionized water	90	มิลลิลิตร

กวนเบาๆ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.1.5 Sample buffer (SDS reducing buffer)

Deionized water	1.9	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl , พีเอช 6.8	0.5	มิลลิลิตร
Glycerol	0.4	มิลลิลิตร
10 % SDS	0.8	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
1 %Bromphenol blue	0.2	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	4	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.1.6 5x Electrode buffer , พีเอช 8.3

ใช้สำหรับเป็นสื่อขณะผ่านกระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีน ประกอบด้วย

Tris base	9	กรัม
Glycine	43.2	กรัม
SDS	3	กรัม

ละลายทุกชนิดในน้ำกลั่น deionized 600 มิลลิลิตร พีเอช 8.3 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้เจือจาง 5 เท่า

3.1.7 Destain solution

Methanol	25	ส่วน
Acetic acid	10	ส่วน
น้ำกลั่น	65	ส่วน

3.2 การเตรียม gel ซึ่งประกอบด้วย running gel 10% และ stacking gel 4%

	10 %gel	4 %gel	ปริมาตร
Deionized water	6.7	6.1	มิลลิลิตร
1.5 M Tris HCl, พีเอช 8.8	5	-	มิลลิลิตร
พีเอช 6.8	-	2.5	มิลลิลิตร
10 %(w/v) SDS stock	200	100	ไมโครลิตร
Acrylamide/Bis (30%stock)	8	1.33	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่ผสมกันนี้ไปทำการไล่ฟองอากาศ เมื่อใช้จึงเติมสารละลาย 10 % ammonium persulfate ในสารละลาย running gel 10% และ stacking gel 4% ปริมาตร 200 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ และ TEMED ในสารละลาย running gel 10% และ stacking gel 4% ปริมาตร 10 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วกวนให้เข้ากันเบาๆ

3.3 ขั้นตอนการ run ตัวอย่าง

การเตรียมเครื่องมือ เช็ดแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาดด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 วาง spacer ลงที่ขอบแผ่นกระจก ทำการประกบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน หนีบกระจกให้ แน่นด้วยตัวหนีบ เตรียม running gel ให้มีปริมาตรเป็น 3 ใน 4 ส่วนของกระจก และ stacking gel ให้มีปริมาตร 1 ใน 4 ของแผ่นกระจก หลังจากนั้นนำ running gel ที่เตรียมไว้เทลงในช่องว่างระหว่าง กระจกทั้ง 2 แผ่น เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยที่ผิวหน้าของ running gel เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว เอียงกระจกเพื่อเทน้ำที่ผิวหน้าเจลออก เท stacking gel ทับผิวหน้า running gel ที่แข็งตัวแล้ว และทำช่อง (well) สำหรับใส่สารตัวอย่าง โดยใช้ template comb

กดลงใน stacking gel ในขณะที่เจลยังไม่แข็งตัว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ทำการดึง template comb ออก นำ แผ่นกระจกที่เตรียมได้ไปไว้ใน chamber แล้วเท electrode buffer ที่เตรียมไว้ให้ท่วมถึง well

การเตรียมตัวอย่าง ผสมตัวอย่างกับ sample buffer ในอัตราส่วน 10 : 10 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด นาน 4 นาที เติมตัวอย่างลงใน well ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อกระแสไฟฟ้าให้เคลื่อนจากขั้งลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ หยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่เกือบถึงปลายสุดของ running gel แกะแผ่นเจลออกอย่างระมัดระวัง นำมาย้อมสีด้วยสีย้อมโปรตีน coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลาข้ามคืน แล้วล้างสีด้วย destaning solution จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้หาได้โดยวิธีของ Hartree-Lowry (1972) วิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent

สารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

1. สารละลายร้อยละ 2 ของ $NaCO_3$ ใน 0.1 N NaOH
2. สารละลายร้อยละ 2 ของ Potassium sodium tartrate
3. สารละลายร้อยละ 1 ของ $CuSO_4.5H_2O$
4. สารละลายร้อยละ 1 ของ 1 N Phenol reagent (Folin-Ciocateu)
5. สารละลายผสมของสารละลาย 1, 2 และ 3 ในอัตราส่วน 100 : 1 : 1 สารละลายนี้ต้องใช้ทันทีหลังผสม

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำตามขั้นตอนดังนี้ปิเปตสารละลายโปรตีนลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย (5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย (4) เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งไว้ 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ใช้ Phosphate buffer 0.1 M พีเอช 6.0 เป็น blank คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ Bovine serum albumin 25 – 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีน

5. การเตรียมลินามาริน (linamarin)

นำเปลือกของหัวมันสำปะหลังที่ทำความสะอาดแล้ว หั่นฝอยแล้วใส่ถาดนำเข้าอบแห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำเปลือกที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมครอน ชั่งน้ำหนักเปลือกบดละเอียดต่อสารสกัด ในอัตราส่วน 15 : 150 กรัม ปั่นผสมนาน 2 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ที่อยู่ในรูปไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (ลินามาริน) โดยคำนวณค่าที่ได้ หาความเข้มข้นของลินามารินที่สกัดได้

ภาคผนวก ข

การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส

1. <u>ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรม (optimum temperature) และความคงตัว (temperature stability) ของเอนไซม์ลินามาเรส</u>

ตารางผนวกที่ ข1 ผลคุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

Temp.	Optimum temperature		Temperature stability	
	Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
20	2.16	38	2.88	59
25	2.35	41	4.45	91
30	2.56	45	4.75	97
35	3.02	53	4.90	100
40	3.36	58	4.82	98
45	4.14	72	nd	nd
50	4.33	75	4.72	96
60	5.74	100	2.42	49
65	1.78	31	0.21	4
70	0	0	0	0

หมายเหตุ nd คือ not determined

ตารางผนวกที่ ข2 ผลคุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ

Temp.	Optimum temperature		Temperature stability	
	Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
20	2.21	37	4.92	93
25	2.42	40	5.11	97
30	2.70	45	5.20	98
35	3.06	51	5.28	100
40	3.19	53	5.02	95
45	4.27	71	nd	nd
50	5.07	84	4.78	91
60	6.03	100	3.43	65
65	3.40	56	0.92	17
70	0	0	0	0

หมายเหตุ nd คือ not determined

ตารางผนวกที่ ข3 ผลคุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Temp.	Optimum temperature		Temperature stability	
	Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
20	2.44	37	5.37	98
25	2.65	40	4.81	88
30	2.96	45	5.36	98
35	3.05	46	5.48	100
40	3.72	56	5.10	93
45	4.01	61	nd	nd
50	5.65	85	5.07	92
60	6.61	100	3.75	68
65	3.53	53	1.00	18
70	0	0	0	0

หมายเหตุ nd คือ not determined

ตารางผนวกที่ ข4 ผลคุณสมบัติทางอุณหภูมิของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

Temp.	Optimum temperature		Temperature stability	
	Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
20	2.25	37	5.76	93
25	2.53	41	5.72	92
30	2.72	44	6.20	100
35	3.12	51	5.42	87
40	3.20	52	5.05	81
45	3.80	62	nd	nd
50	4.23	69	4.89	79
60	6.13	100	3.54	57
65	3.57	58	0.81	13
70	0	0	0	0

หมายเหตุ nd คือ not determined

2. <u>ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อกิจกรรม (pH optimum) และความคงตัว (pH stability) ของเอนไซม์ลินามาเรส</u>

ตารางผนวกที่ ข5 ผลคุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า (Linamarase™)

บัฟเฟอร์	pH	pH optimum		pH stability	
		Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
Acetate buffer					
	3.5	1.42	29	3.80	95
	4.0	1.82	38	3.38	84
	4.5	2.57	53	3.47	86
	5.0	3.49	72	3.40	85
	5.5	4.20	87	3.47	87
	6.0	4.49	93	3.47	86
Phosphate buffer					
	5.5	4.54	94	3.62	90
	6.0	4.71	97	3.59	89
	6.5	4.79	99	4.01	100
	7.0	4.85	100	3.95	99
	7.5	4.82	99	3.67	92
	8.0	4.75	98	3.73	93

ตารางผนวกที่ ข6 ผลคุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสดิบ

บัฟเฟอร์	pH	pH optimum		pH stability	
		Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
Acetate buffer					
	3.5	1.51	31	3.69	96
	4.0	1.88	39	3.72	97
	4.5	2.72	56	3.82	100
	5.0	3.48	72	3.66	96
	5.5	4.35	90	3.75	98
	6.0	4.63	95	3.83	100
Phosphate buffer					
	5.5	4.71	97	3.74	98
	6.0	4.77	98	3.73	97
	6.5	4.78	99	3.72	97
	7.0	4.85	100	3.66	96
	7.5	4.69	97	3.65	95
	8.0	4.70	97	3.66	96

ตารางผนวกที่ ข7 ผลคุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

บัฟเฟอร์	pH	pH optimum		pH stability	
		Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
Acetate buffer					
	3.5	1.86	39	3.76	90
	4.0	2.01	42	3.77	91
	4.5	2.67	56	3.80	91
	5.0	3.66	77	3.61	87
	5.5	4.38	92	3.60	87
	6.0	4.58	96	3.39	81
Phosphate buffer					
	5.5	4.68	98	3.62	87
	6.0	4.69	98	3.92	94
	6.5	4.78	100	3.55	85
	7.0	4.78	100	4.12	99
	7.5	4.74	99	4.16	100
	8.0	4.66	97	4.12	99

ตารางผนวกที่ ข8 ผลคุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่างของเอนไซม์ลินามาเรสที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟชนิด DEAE-cellulose

บัฟเฟอร์	pH	pH optimum		pH stability	
		Activity (unit/ml)	% Relative activity	Activity (unit/ml)	% Relative activity
Acetate buffer					
	3.5	0.98	19	3.84	97
	4.0	1.65	31	3.37	85
	4.5	2.67	51	3.84	96
	5.0	3.77	72	3.97	100
	5.5	4.50	86	3.90	98
	6.0	4.90	94	3.95	99
Phosphate buffer					
	5.5	4.89	94	3.62	91
	6.0	5.05	97	3.68	92
	6.5	5.17	99	3.81	96
	7.0	5.23	100	3.98	100
	7.5	5.17	99	3.84	97
	8.0	5.10	97	3.62	91

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวอุษา ย้อนโคกสูง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2545)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย (พ.ศ. 2547)
	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)